

博士論文

糖化表皮のバリア機能に関する研究

平成 28 年度

城西大学薬学部薬科学科 皮膚生理学研究室

横田 麻美

目次

略語	1
緒言	4
第1章 糖化表皮における角層細胞間脂質の量的変動とその影響	9
第1節 緒論	9
第2節 実験方法	12
2-1. 試薬および実験材料	12
2-2. 細胞培養	13
2-3. 皮膚の評価	13
2-4. 細胞生存率の測定	14
2-5. 免疫蛍光染色	15
2-6. 脂質の抽出	16
2-7. 脂質の定量	16
2-8. RNA の抽出	17
2-9. 遺伝子発現量の測定	17
2-10. 脂肪酸種の同定	19
2-11. 角層細胞間脂質リポソームの調製	19
2-12. 角層細胞間脂質リポソームの物性評価	20
2-13. 角層細胞間脂質リポソームの膜流動性評価	20
2-14. 統計処理	21
第3節 結果	22

3-1.	糖化誘導三次元培養表皮の評価	22
3-2.	三次元培養表皮中脂質量の評価	24
3-3.	脂質代謝関連遺伝子発現量の測定	28
3-4.	脂肪酸種の測定	34
3-5.	疑似糖化表皮脂質リポソームの物性評価	37
3-6.	糖化表皮におけるタイトジャンクションの発現	40
第4節	考察	42
第2章	糖化皮膚における化合物透過性の変化	48
第1節	緒論	48
第2節	実験方法	50
2-1.	実験動物	50
2-2.	試薬および実験材料	50
2-3.	マウス皮膚の糖化誘導	50
2-4.	透過試験	51
2-5.	化合物の皮膚透過量の解析	51
2-6.	糖化指標の測定および皮膚中化合物量の測定	52
2-7.	皮膚計測	52
2-8.	免疫蛍光染色	53
2-9.	角層サンプルの調製および染色	54
2-10.	統計処理	54
第3節	結果	55
3-1.	<i>In vitro</i> 糖化皮膚モデルの特性評価	55

3-2.	低分子化合物の糖化皮膚透過性の評価	60
3-3.	糖化皮膚における化合物の浸透性・透過性に対する角層の寄与	63
第4節	考察	66
第3章	ヒト皮膚における Glycer-AGEs の蓄積	70
第1節	緒論	70
第2節	実験方法	73
2-1.	試薬および実験材料	73
2-2.	免疫蛍光染色	73
2-3.	実験動物	74
2-4.	マウス皮膚の糖化誘導	74
2-5.	皮膚計測	74
2-6.	アミノ酸分析	74
2-7.	統計解析	75
第3節	結果	76
3-1.	ヒト皮膚における Glycer-AGEs の観察	76
3-2.	GO、GA による <i>in vitro</i> 糖化誘導皮膚の比較	77
3-3.	GO、GA による修飾 Lys 量の測定	79
第4節	考察	81
結論		82
謝辞		87
参考文献		88

略語

aCDase: acid Ceramidase

AD: Atopic dermatitis

AGEs: Advanced glycation endproducts

BPB: 4-Bromophenacyl bromide

BSA: Bovine serum albumin

CER: Ceramides

CERS: Ceramide synthase

Chol: Cholesterol

ChREBP: Carbohydrate response element binding protein

CLDN: Claudin

CML: Carboxymethyl lysine

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

ECM: Extracellular matrix

ELOVL: Elongation of very long chain fatty acids protein

ESR: Electron spin resonance

FA: Fatty acid

FAS: Fatty acid synthase

FB1: Fumonisin B1

FBS: Fetal bovine serum

FD-4: Fluorescein isothiocyanate–dextran (average M.W. 4,000)

FL-Na: Sodium fluorescein

G-SCLL: Glycated epidermis-mimetic SCLL

GA: Glyceraldehyde

GC-MS: Gas chromatography-mass spectrometry

GO: Glyoxal

HaCaT: Human adult low calcium temperature

HPTLC: High performance thin layer chromatography

K10: Keratin 10

LXR: Lipid synthesis including liver X receptors

MMP: Matrix metalloproteinase

MTT: Thiazolyl blue tetrazolium bromide

NF- κ B: Nuclear factor- κ B

OCLDN: Occludin

PBS: Phosphate buffered saline

PLA₂: Phospho lipase A₂

RAGE: Receptor for AGEs

Real time RT PCR: Real time reverse transcription polymerase chain reaction

ROS: Reactive oxygen species

SB: Stratum basale

SC: Stratum corneum

SCLL: Stratum corneum lipid liposome

SFA: Saturated fatty acid

SG: Stratum granulosum

SM: Sphingomyelin

SMase: Sphingomyelinase

SPT: Serine palmitoyl transferase

SREBP-1c: Sterol regulatory element-binding protein-1c

SS: Stratum spinosum

TEWL: Transepidermal water loss

TJ: Tight junction

緒言

化粧品や医薬品の皮膚への適用は、局所および全身への効果を期待して日常的に行われている。皮膚は、外界と体内を隔てる境界に位置し、刺激や微生物の感染、生体の生命維持に不可欠である体内の水分蒸散や放熱防止等、重要なバリアとして機能しており、化合物の経皮送達の観点からはその非侵襲性や投与量のコントロールの簡便性、肝初回通過効果を避けられる代謝面での優位性から魅力的な投与部位として注目されている¹⁾。一方、優れたバリア機能は経皮送達の障壁にもなりうるため、皮膚バリア機能を非侵襲的に克服するための製剤的な工夫や、イオントフォoresisやエレクトロポレーション、マイクロニードル等電氣的・物理的な処置を介した工夫がなされている²⁻⁴⁾。

皮膚は最外面に位置する角層 (Stratum corneum: SC) の下に生きた表皮層、真皮層を有し、生きた表皮層は分化状態によりさらに顆粒層 (Stratum granulosum: SG)、有棘層 (Stratum spinosum: SS)、基底層 (Stratum basale: SB) に分類される。皮膚の厚みは部位により大きく異なるが、およそ 1-2 mm 程度である。角層厚はそのうち 20 μm 程度と非常に菲薄であるものの、バリア機能においては最も重要な役割を担う。角層は、顆粒層の細胞が脱核を経て形成された角質細胞と角層細胞間脂質より構成され、レンガ (角質細胞)・モルタル (角層細胞間脂質) モデルと呼ばれる通り、角質細胞が角層細胞間脂質に取り囲まれたような形態をとる。角質細胞間はコルネオデスモソームと呼ばれる接着構造を介して結合しており、カリクレイン 5 やカリクレイン 7 などのセリンプロテアーゼによる

消化を受けると、垢として剥がれ落ちる。この過程はターンオーバーと呼ばれており、正常な皮膚ではおよそ 1-1.5 ヶ月とされている。角層細胞間脂質の本体は、およそ等モルで構成されたセラミド (Ceramide: CER)、コレステロール (Cholesterol: Chol)、脂肪酸 (Fatty acid: FA) であり、規則的な構造を形成する^{5, 6)}。これら角層細胞間脂質は、主に表皮の分化に伴い発現する酵素による変換を経て合成される。顆粒層で存在が認められるラメラ顆粒にはリン脂質やグルコシルセラミド、スフィンゴミエリン (Sphingomyelin: SM)、Chol などに加え代謝酵素が含まれており、顆粒層と角層の界面へエキソサイトーシスにより放出されると、脂質群は代謝を受けラメラ構造を形成する脂質となる⁷⁻¹¹⁾。角層の X 線回折実験および電子顕微鏡を用いた観察により、これらの脂質は短周期・長周期のラメラ構造を形成することが報告されている^{12, 13)}。また、ラメラ構造に垂直な断面では炭化水素鎖の規則的な充填構造が観察される。化合物の透過は角層細胞間脂質を通るルートがほとんどを占めるため、これら脂質の代謝や構成比率の理解は、健やかな皮膚状態を保つ上でも、化合物の適用を考慮する上でも重要である。

近年、人口の高齢化や食習慣の変化に直面し、慢性的な高血糖状態を示す糖尿病患者の増加が世界的に問題となっている。高血糖状態により引き起こされる終末糖化産物 (Advanced glycation endproducts: AGEs) の臓器への蓄積は、糖尿病性合併症の発症と強く相関する他、様々な疾患に関連し生活習慣病の増悪に寄与していることが明らかになっている。糖化はグルコース等の還元糖のカ

ルボニル基とタンパク質、特に塩基性アミノ酸残基中のアミノ基との間で起こる非酵素的なメイラード反応¹⁴⁾を介して起こり、脱水・縮合を経て AGEs が生成される。AGEs は、タンパク質や一部の脂質、核酸に対し非生理的な架橋形成による変性を引き起こす他^{15, 16)}、AGEs 受容体 (Receptor for AGEs: RAGE) に結合し、下流の ROS-NFκB (Reactive oxygen species-nuclear factor κB) 経路を介し炎症反応を誘導する (Fig. 1)^{17, 18)}。最近では、代謝性疾患と ER (Endoplasmic reticulum) ストレスとの関連も指摘されており²⁶⁾、膵β細胞では高血糖病態による ER ストレスとアポトーシスの関連が示されている^{27, 28)}。皮膚においては、AGEs は表皮ではケラチン、真皮ではコラーゲンやエラスチン等の構成タンパク質に蓄積し¹⁹⁻²¹⁾、シワや皮膚の黄変、乾燥等の原因となると考えられている²¹⁻²³⁾。また、表皮角化細胞には RAGE の発現が認められており、AGEs の RAGE を介した炎症反応の誘起も報告されている^{24, 25)}。

このように AGEs は皮膚の老化に大きく関与しているが²⁹⁾、これまでバリア機能、特にヒト角層細胞間脂質へ与える影響については明らかになっていなかった。そこで本研究では糖と脂質が一部その代謝経路を共有していることに着想を得、糖化表皮のバリア機能の変化およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。AGEs の皮膚バリア機能に対する影響を、生理的・物理的な観点から実験的に明らかにするため、以下三章の構成で研究を行った。第一章では、糖化表皮におけるバリア機能の変化や角層細胞間脂質の量的変動およびその影響について調査した。第二章では、摘出マウス皮膚を用いて加速的な条件

下で作製した *in vitro* 糖化モデル皮膚を用いて糖化表皮における化合物透過性の変化を調査した。第三章では、ヒト皮膚における AGEs の蓄積について、抗グリセルアルデヒド由来 AGEs 抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、その局在や由来の異なる AGEs 間の違いを調査した。

生体の最外面を構成する皮膚の糖化が他の臓器と異なる特徴として、症状の発現に加え、見た目の印象を左右する点が挙げられる。化粧行為等の介入によるこのような現象への対処は、心身共に健やかな暮らしのためにも重要である。本研究の目的を達成することによって、皮膚における糖化現象を理解し、適切な予防手段を提案することができると考えられる。

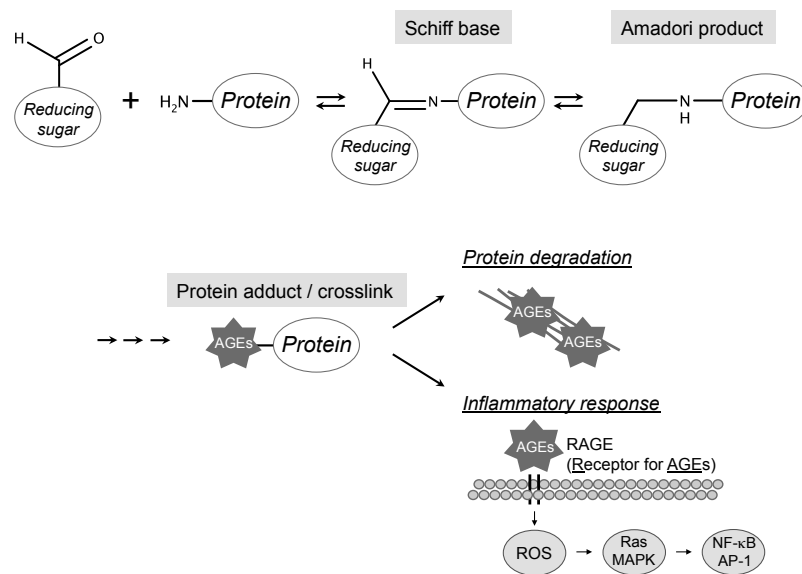


Figure 1. Schematic presentation of AGEs formation and their features

Aldehyde groups of reducing sugar react with amino groups of proteins to form Schiff base and more stable amadori products. The resulting AGEs cause protein degradation as well as inflammatory response.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase, AP-1: Activator Protein-1

第 1 章

糖化表皮における角層細胞間脂質の

量的変動とその影響

第 1 節 緒論

加齢や慢性的な高血糖に伴い生成・蓄積する AGEs は、皮膚においては年単位でターンオーバーが起これるとされる真皮の細胞外マトリックス (Extracellular matrix: ECM) であるコラーゲンやエラスチンへの蓄積が主な研究対象であり、マトリックスの脆弱化によるシワの形成メカニズムの一つとして考えられていた^{19,21)}。近年、表皮に存在するケラチン 10 (Keratin 10: K10) がその基質となることが報告され、ターンオーバーの短い表皮もその標的となることが明らかとなっている。

皮膚は肝臓に次ぎ活発に脂質合成が行われる臓器として知られるが³⁰⁾、それは皮膚透過の最大のバリアとなる角層が CER や Chol、FA をおよそ等モルずつ含む皮膚バリア特有の脂質ラメラ構造を有し、これらの脂質を生きた表皮層において活発に生成する必要があるためである。脂肪酸の代謝は、acetyl coA を介し一部そのエネルギー産生経路をグルコースの代謝と共有している。近年、非脂肪組織における過剰な脂肪酸の蓄積は細胞毒性を誘導することも報告されている^{31,32)}。脂肪酸は単純脂質であり、リン脂質やトリアシルグリセロール、CER 等を構成すると同時に、細胞膜の主要構成成分として、またエネルギー産生経

路における重要な基質として遍在している。様々な鎖長の脂肪酸は、複合脂質の分解、または脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase: FAS) によるパルミチン酸の生合成を経て産生される。パルミチン酸は、ELOVL 脂肪酸伸長酵素 (Elongation of very long chain fatty acids protein: ELOVL) による伸長反応を受け、角層細胞間脂質に特徴的な極長鎖脂肪酸種が生成される。また、CER の生成経路は *de novo* 経路、salvage 経路、スフィンゴミエリナーゼ (Sphingomyelinase: SMase) 経路に大別される。*De novo* 経路ではセリンとパルミトイル CoA を出発物質とし、律速酵素であるセリンパルミトイル転移酵素 (Serine palmitoyl transferase: SPT) や、CER 合成酵素 (Ceramide synthase: CERS) による縮合やアシル化を経て CER が生成される。Salvage 経路では、CER はスフィンゴ脂質の最小単位であるスフィンゴシンを再利用し、CERS による変換を経て生成される。SMase 経路では、SMase による SM の加水分解から CER とホスホコリンが生成される³³⁻³⁵⁾。Chol は皮膚においても、HMG-CoA 還元酵素を律速とした生合成が重要な供給源である¹⁾。

これまで糖化皮膚における脂肪酸や関連脂質の代謝やバリア機能へ与える影響については、糖尿病モデルラットやストレプトゾシン誘発糖尿病ヘアレスマウスモデルにて解析が行われている経緯があるものの^{36, 37)}、ヒト細胞を用いた知見は得られていない。そこで本章では、ヒト三次元表皮モデルに糖化を誘導し、経表皮水分蒸散量 (Transepidermal water loss: TEWL) の測定によりバリア機能の評価を、高性能薄層クロマトグラフィー (High performance thin layer

chromatography: HPTLC) やガスクロマトグラフィー質量分析 (Gas chromatography-mass spectrometry: GC-MS) により脂質含有量の定量を行った。

また、関連する代謝酵素の遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) 法により明らかにした。これらの検討から、糖化により表皮脂質の構成や代謝に変化が認められたため、糖化が脂質ラメラの物性へ与える影響について、糖化表皮の脂質組成を模倣した角層細胞間脂質リポソーム (Stratum corneum lipids liposome: SCLL) を作製し、その物性評価および膜流動性の評価を行った。最後に、糖化が皮膚第二のバリアであるタイトジャンクション (Tight junction: TJ) へ与える影響を調査した。TJ は SG 第二層に存在する細胞間接着構造であり、水溶性分子に対するバリアとして機能する。糖化を誘導した三次元培養表皮における TJ 構成タンパク質の遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定することにより TJ の寄与を予想した。

以上のように本章では、糖化と皮膚バリア機能の関連性について、多角的な生物学的解析を試み、考察した。

第 2 節 実験方法

2-1. 試薬および実験材料

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)、thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) 試薬、リポソーム調製および評価用の cholesterol、cholesterol sulfate、palmitic acid、5-DOXYL-stearic acid (5-DSA) は Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入した。alamarBlue[®]は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, U.S.A.) より購入した。Glyoxal (GO)、cholesterol、palmitic acid、クロロホルム、メタノールは和光純薬工業株式会社(大阪、日本)より購入した。抗 AGE 抗体(clone 6D12)は株式会社トランスジェニック (福岡、日本) より購入した。Alexa546 標識二次抗体は、Life Technologies (Carlsbad, CA, U.S.A.) より購入した。CER [NS]、CER [AS] は Matreya (State College, PA, U.S.A.) より、CER [NP]、CER [AP] は Evonic Industries AG (Goldschmidtstraße, Essen, Germany) より購入した。2,2-Dimethoxypropane は東京化成工業株式会社 (東京、日本) より購入した。F.A.M.E. Mix RM-3 は SUPELCO (Bellefonte, PA, U.S.A.) より購入した。

2-2. 細胞培養

三次元培養表皮モデルとして、EPISKIN (EPISKIN, rue Alexandre Fleming, Lyon, France)、幼若モデルとして RHE 6D (EPISKIN) を用いた。本モデルは、担体上でヒト表皮細胞を培養して作製されたものであり、気液界面で培養することにより、正常な角層機能を持つ再生表皮を形成する。専用の増殖用培地を用い、37°C、5%CO₂ 条件下にて培養を行った。

HaCaT 細胞は 10%FBS (Fetal bovine serum) 含有 DMEM を用い、37°C、5%CO₂ 条件下にて培養を行った。

2-3. 皮膚の評価

経表皮水分損失量 (TEWL) の測定

TEWL 値は、三次元培養表皮を測定環境下にて 45 分間馴化後、VAPOSCAN AS-VT100RS (有限会社アサヒバイオメッド、東京、日本) を用いて測定した。バリア機能は、GO 処理前の TEWL 値から GO 暴露 72 時間後の TEWL 値を差し引いた値 (Δ TEWL) により評価した (Eq. 1)。培養日数の経過に伴い、角層が積層するため、正常なバリア機能を有するモデルでは TEWL 値は減少する。すなわち、 Δ TEWL 値は増加する。一方、バリア破壊の介入があると、TEWL 値が高くなるため、正常モデルと比較し Δ TEWL 値は減少する。

Eq. 1

$$\Delta\text{TEWL} = \text{TEWL}_{0\text{ h}} - \text{TEWL}_{72\text{ h}}$$

表皮色の測定

皮膚色は、三次元培養表皮を白板の上に置き、基底層側よりプローブをあて、色彩色差計 CR-400（コニカミノルタ株式会社、東京、日本）を用いて測定した。データは $L^*a^*b^*$ 表色系で表し、黄味の指標として、 b^* を使用した。

2-4. 細胞生存率の測定

三次元培養表皮の生存率測定

三次元培養表皮の生存率は、**alamarBlue[®]** を用いて測定した。三次元培養表皮を 24 時間の前培養後、基底層側より培地に溶解した種々濃度（0-5 mM）の GO に 72 時間暴露したものを、コントロールおよび糖化表皮として使用した。この三次元培養表皮を基底層側より培地：**alamarBlue[®]** = 10 : 1（v/v）となるように調製した溶液に暴露した。4 時間培養後、マイクロプレートリーダー（SpectraMax M2[®], Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.）を用い、回収した培地中の蛍光を Ex: 570 nm/Em: 585 nm の条件にて測定した。各群の細胞生存率は、コントロールを 100%とした際の相対値として算出した。

HaCaT 細胞の生存率測定

HaCaT 細胞の生存率は、MTT 法にて測定した。HaCaT 細胞を播種し、24 時間後、種々濃度（0-10 mM）の GO に 30 分間暴露したものを糖化表皮角化細胞とした。10%FBS 含有 DMEM にて 2 度洗浄後、同培地を用いてさらに 48 時間培

養し、生存率の測定に供した。カルシウム・マグネシウム不含 phosphate buffered saline: PBS(-)にて2度細胞を洗浄後、0.5 mg/mL の MTT を含有する 10%FBS 含有 DMEM に交換し、4 時間培養を行った。生成したフォルマザンを 0.04 M 塩酸 / イソプロピルアルコール溶液で溶解し、マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2[®]) を用いて 570 nm における吸光度を測定した。各群の細胞生存率は、コントロールを 100% とした際の相対値として算出した。

2-5. 免疫蛍光染色

HaCaT 細胞を培養用スライドガラス (Fisherbrand[®] Microscope Cover Glass, Thermo Fisher Scientific) 上に播種し、2-4 に記載の方法で糖化を誘導した。糖化誘導 48 時間後、細胞を PBS(-) で 2 度洗浄し、冷メタノールで -30°C、15 分間処理することにより細胞を固定した。2% BSA/PBS(-) 溶液で室温、1 時間反応させることによりブロッッキングを行った。1 次抗体は、抗 AGEs 抗体を Can Get Signal immunostain[®] Solution A (東洋紡株式会社、大阪、日本) に 1/200 で希釈し、4°C、オーバーナイトで反応させた。結合した抗体を Alexa546 標識の 2 次抗体 (1/200、抗体/Can Get Signal immunostain[®] Solution A) で室温、1 時間処理することにより可視化した。洗浄後、Hoechst33258 (株式会社同仁化学研究所、熊本、日本) で核染色を施した後、倒立顕微鏡 IX71 (オリンパス株式会社、東京、日本) を用いて蛍光観察を行った。

2-6. 脂質の抽出

トランスウェルからメスを用いて三次元培養表皮を回収し、クロロホルム/メタノール (2:1, v/v) に浸漬し、氷上にて SONIFIRE 250 Advanced (Branson, Danbury, CT, U.S.A.)により超音波処理を行い脂質を抽出した。抽出液を 0.20 μm のフィルター (Merck Millipore Ltd., Billerica, MO, U.S.A.) にてろ過後、窒素気流下にて有機溶媒を除去した。

HaCaT 細胞からの脂質抽出は、Bligh and Dyer 法³⁸⁾により行い、三次元培養表皮と同様の方法にて脂質サンプルを得た。全ての脂質は、クロロホルム/メタノール (2:1, v/v) に溶解し、試験に使用した。

2-7. 脂質の定量

HPTLCにより、脂質の分離を行った。脂質は、各サンプル 10 μL を HPTLC Silica gel 60 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) にキャピラリーを用いてスポットした。CER の展開条件はクロロホルム/メタノール/酢酸 (190:9:1, v/v)、FA、Chol の展開条件はヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸 (80:20:1, v/v) とし、2 回展開を行った。乾燥させたプレートに 10%硫酸銅・8%リン酸試薬を噴霧後、ホットプレート (TLC Plate Heater, CAMAG, Muttenz, Basel-Landschaft, Switzerland) 上で 180°C、10 分間加熱し、脂質を可視化した。プレートは ChemidocTM XRS+ (Biorad, Hercules, CA, U.S.A.) にて撮影し、Image LabTM (Biorad) を用いてバンド密度を数値化した。定量値は同プレートより得られた各脂質の検量線より算出した。脂質量の補正

に用いたタンパク質量は、Lowry 法³⁹⁾により定量した。

2-8. RNA の抽出

細胞からの RNA の抽出は、RNA iso Plus（タカラバイオ株式会社、滋賀、日本）を用いて規定の手順に従い行った。三次元培養表皮においては、RNA iso Plus 中、眼科ハサミを用いて皮膚を細断後抽出を行った。NanoDrop 1000（Thermo Fisher Scientific）を用いて総 RNA 量を測定し、OD₂₆₀/OD₂₈₀ 値により純度を確認した。

2-9. 遺伝子発現量の測定

抽出した総 RNA は濃度を揃え、PrimeScript[®]（タカラバイオ株式会社）を用いて規定の手順に従いサーマルサイクラー（Veriti, Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.）上で逆転写反応を行い、cDNA を作製した。Real time PCR は SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™]（タカラバイオ株式会社）を使用し、内部標準として ROX を用いた。各遺伝子の増幅に用いたプライマー配列を Table 1 に示す。StepOnePlus[™]（Applied Biosystems）を用いて増幅する cDNA をリアルタイムに検出・測定した。評価は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いた相対定量で行った。

Table 1. Sequences of primers for real time RT-PCR

Gene		Sequence (5' to 3')
<i>aCDase</i>	Forward	CCTTCTTCCTTGATGATCGC
	Reverse	GTGGAGTTCACCATGGTTCG
<i>CERS3</i>	Forward	ACATTCCACAAGGCAACCATTG
	Reverse	CTCTTGATTCCGCCGACTCC
<i>CERS4</i>	Forward	CTTCGTGGCGGTCATCCTG
	Reverse	TGTAACAGCAGCACCAGAGAG
<i>CLDN1</i>	Forward	CCAAATTCGTACCTGGCATT
	Reverse	CCGTTGGCATGAAGTGTATG
<i>CLDN4</i>	Forward	GAGCCGTGGCACCTTACACG
	Reverse	GGCTGCTTTGCTGCAACTGTC
<i>ELOVL1</i>	Forward	TGGCACTCTCCCTCTACATTGTCTA
	Reverse	TGAACTTGGAGAAGAGGAAGAGC
<i>ELOVL2</i>	Forward	TCTGCTCTCAATATGGCTGGGTAA
	Reverse	GCGCTGGTAAGATCTTGACACTGTA
<i>ELOVL3</i>	Forward	GCCCTATAACTTCGAGCTGCTGTCCAA
	Reverse	CCACAGCGATGAGAACCAGGTA
<i>ELOVL4</i>	Forward	GGCATGCAGTCATGAGAATTACAGA
	Reverse	GGGAACCAGTACAGAATGTTCAAA
<i>ELOVL5</i>	Forward	GATTGCCTATTTACCGTTTGACAGA
	Reverse	TTTAGACCCTGGCAACCAGTTC
<i>ELOVL6</i>	Forward	TGCTAAGCAAAGCACCCGAAC
	Reverse	CAGGAGCACAGTGATGTGGTGA
<i>ELOVL7</i>	Forward	TTGGGACCAAAGCTCATGGAA
	Reverse	AAAGCTGTGGGTGACCGTGAATA
<i>FASN</i>	Forward	TATGCTTCTTCGTGCAGCAGTT
	Reverse	GCTGCCACACGCTCCTCTAG
<i>GAPDH</i>	Forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGT
	Reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTC
<i>OCLDN</i>	Forward	GGCAAATGCAGATGATAGGC
	Reverse	AAGCTGTGGAGCGGAATGT
<i>SPT1</i>	Forward	TGTTCCACCGTGACCACAAC
	Reverse	GCGCGCTACTTGGAGAAAGA
<i>SPT2</i>	Forward	CCTGCTCTTGTTGGCAAAGG
	Reverse	GCTCCCAGAACCAGTGATGC

2-10. 脂肪酸種の同定

脂肪酸種は内田らの報告^{40, 41)}に改変を加えて測定した。HPTLC 法により、脂質を分離し遊離脂肪酸画分を分取した。クロロホルム/メタノール (2:1, v/v) にシリカゲルを浸漬し、20 分間の超音波処理により脂質を抽出した。抽出液をフィルターろ過後、窒素気流下にて有機溶媒を除去した。酸性条件下、2,2-dimethoxypropane を用いて脂肪酸のメチルエステル化を行った。得られたメチルエステル化脂肪酸を、炭素数 15 の飽和脂肪酸を内部標準物質とし GC-MS 分析に供した。測定は以下の条件にて実施した。Restek RTX-5 column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 mm d.f., Restek Corporation, Bellefonte, PA, U.S.A.) を用い、初期温度 110°C、速度 10°C/分にて 300°Cまで昇温することによりメチルエステル化脂肪酸を分離した。ガスクロマトグラフィーには HP6890 series GC system (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, U.S.A.) を、質量分析計は JMS700 (日本電子株式会社、東京、日本) を用いた。

2-11. 角層細胞間脂質リポソームの調製

SCLL および糖化表皮の脂質構成を模した組成の SCLL (疑似糖化表皮脂質リポソーム、Glycated epidermis-mimetic SCLL: G-SCLL) は、Wertz らの方法に従って作製した⁴²⁾。すなわち、クロロホルム：メタノール (2:1, v/v) に溶解した各脂質を記載量分取し (Table 2)、ロータリーエバポレーターにて溶媒を減圧留去して脂質薄膜を得た。PBS(-)を添加し水和後、凍結融解を 5 回繰り返した。エク

ストルーダーを用いて粒子径を 100 nm に調整した。

2-12. 角層細胞間脂質リポソームの物性評価

SCLL の粒子径、 ζ 電位、多分散指数 (PdI) は、ゼータサイザーナノ (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, U.K.) を用いて測定を行った。

2-13. 角層細胞間脂質リポソームの膜流動性評価

SCLL の膜流動性は電子スピン共鳴 (Electron spin resonance: ESR) 法により予測した。5-DSA をメタノールに溶解後、減圧条件下で試験管中に薄膜を形成させた。そこに 2-11 で調製した SCLL を加え室温で 5 分間インキュベーションを行うことによりリポソームを標識した。ラベル化 SCLL は 20 μ L キャピラリ (HIRSCHMANN, Eberstadt, Germany) 中に回収し、パテ (テルモ、東京、日本) でシールを施した。本サンプルを RFR-30 (ラジカルリサーチ社、東京、日本) に装着し、ESR スペクトルを得た。測定は室温で行った。装置の設定条件は、下記の通りとした。

Microwave power: 4.0 mW, Modulation frequency: 9.43 kHz, Modulation amplitude: 0.2 mT, Magnetic field scan: 337.5 mT, Sweep time: 8 min, Detector time constant: 0.1 ms

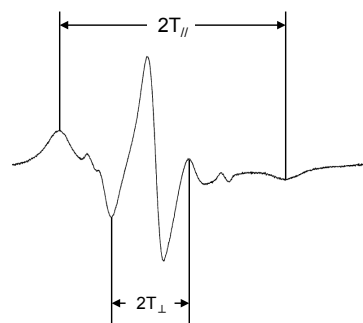
SCLL の膜流動性の指標となる秩序度 (S) は Eq. 2 を用いて算出した。

Eq. 2

$$S = 1/2 (3 \cos^2 \theta - 1)$$

$$= (A_{//} - A_{\perp}) / \{ A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy}) / 2 \} \times 10$$

$$= (2T_{//} / 2 - 2T_{\perp} / 2) / \{ 33.6 - (6.3 + 5.8) / 2 \} \times 10$$



Typical ESR spectrum of 5-DSA

2-14. 統計処理

データは mean \pm S.D. で表し、SAS University Edition (SAS Institute, Cary, NC, U.S.A.) を用いて統計処理を行った。危険率 5% 未満 ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$) を有意差ありとした。

第 3 節 結果

3-1. 糖化誘導三次元培養表皮の評価

糖化表皮中に含まれる角層細胞間脂質量を明らかにするため、三次元培養表皮の基底層側より種々濃度の GO を 72 時間暴露し、糖化誘導三次元培養表皮を作製した。GO はグルコースの分解により生じるジカルボニル化合物であり、反応性が非常に高いため、効率良く AGEs の形成を誘導する^{43, 44)}。正常皮膚からの糖化を再現するために、成熟した表皮組織を有する EPISKIN を、慢性化した糖化状態を再現するために成熟角層を有さない幼若モデルである RHE 6D モデルを使用した。

細胞生存率はいずれのモデルにおいても濃度依存的に有意に減少し、成熟モデルでは 5 mM 処理において有意に減少した (Fig. 2a, $p < 0.001$)。幼若モデルの方が GO に対する感受性は高く、0.5 mM 処理において有意に減少した (Fig. 2b, $p < 0.001$)。糖化による表皮バリア機能の変化を明らかにするため、三次元培養表皮を介した TEWL 値の測定を行った。成熟三次元培養表皮では GO 5 mM 暴露群において、 Δ TEWL 値は有意に減少した (Fig. 2c, $p < 0.05$)。幼若三次元培養表皮では GO 0.5 mM 暴露群より濃度依存的に有意に減少し (Fig. 2d, $p < 0.001$)、細胞生存率と同様、成熟三次元培養表皮よりも GO への感受性が高くなった (Figs. 2c & d)。さらに、成熟モデルにおいては GO 5 mM 処理において顕著な b^* 値の増加が認められた (Fig. 1e, $p < 0.001$)。

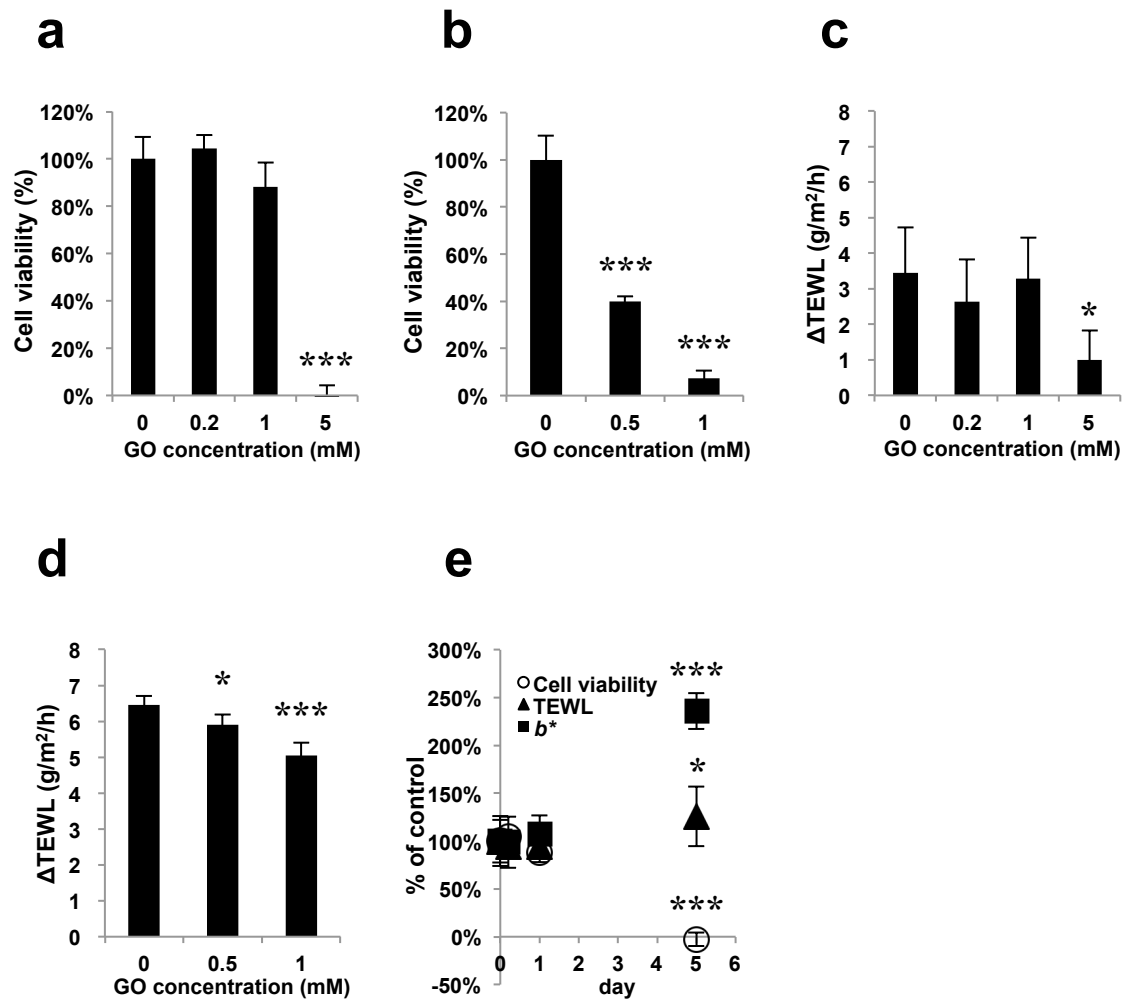


Figure 2. General properties of glycated reconstructed epidermal model

Glycation was induced by hydration with various concentrations of GO from basal side. Viability of mature (a) and immature (b) epidermal model was measured using alamar Blue[®]. Δ TEWL of mature (c) and immature (d) reconstructed epidermal model was measured using vaposcan. Percentile of control of TEWL, viability and b^* value of mature epidermal model was shown in (e). All results are expressed as the mean \pm S.D. of $n = 3-4$ replicates. $*p < 0.05$, $***p < 0.001$, Dunnett's test (vs. 0 mM or 0 day).

3-2. 三次元培養表皮中脂質量の評価

作製した成熟三次元培養表皮モデルより抽出した脂質を HPTLC にて分離し、セラミド、コレステロール、および脂肪酸の定量を行った。正常表皮および糖化表皮 (GO 5 mM 暴露群) に含まれる脂肪酸の量はそれぞれ $196.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $311.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、糖化によりおよそ 1.6 倍の増加が認められた (Fig. 3g, $p < 0.001$)。一方、種々セラミド、コレステロール量に関しては変動が認められなかった (Fig. 3a-f)。

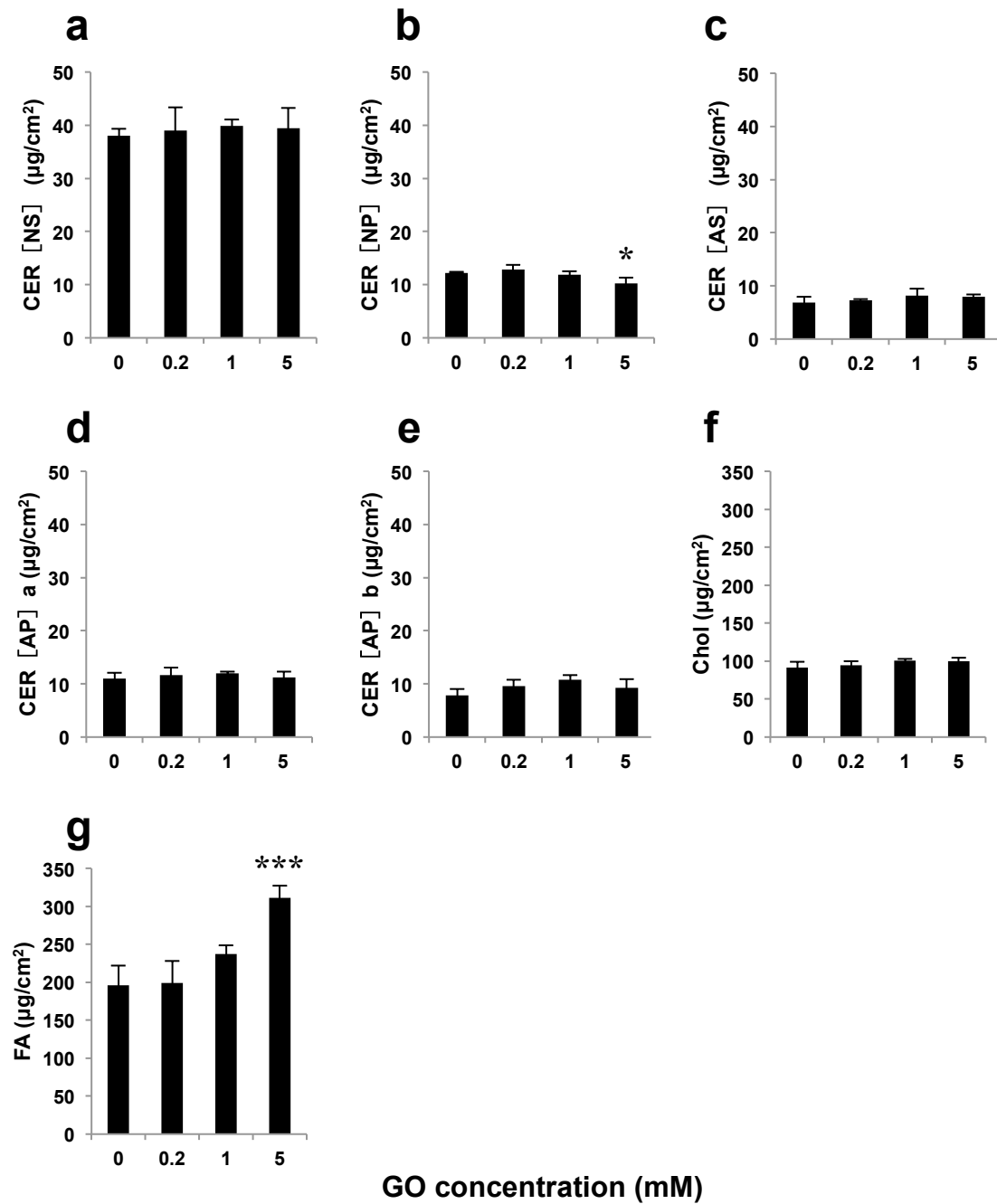


Figure 3. Changes in the content of epidermal lipids in mature reconstructed epidermal model

Lipid contents of mature reconstructed epidermal model were determined after 72 h-exposure to glyoxal by HPTLC: CER[NS] (a), CER[NP] (b), CER[AS] (c), CER[AP]a (d), CER[AP]b (e), Chol (f), FA (g). All results are expressed as the mean \pm S.D. of n = 3 replicates. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Dunnett's test (vs. 0 mM).

一方、幼若モデルにおいては、正常表皮および糖化表皮（GO 1 mM 暴露群）に含まれる脂肪酸の相対量は、糖化により約 1.8 倍の増加が認められた（Fig. 4g, $p < 0.001$ ）。さらに、セラミドに関しては CER [NS]、CER [NP]、および CER [AP] において含有量の有意な減少が認められた（Figs. 4a, b & e）。特に CER [NS] に関しては濃度依存的な減少が認められ、GO 1 mM 暴露群において正常表皮の 0.7 倍となった（Fig. 4a, $p < 0.05$ ）。コレステロール量も濃度依存的に減少し、GO 1 mM 暴露群において正常表皮の 0.8 倍となった（Fig. 4f, $p < 0.01$ ）。

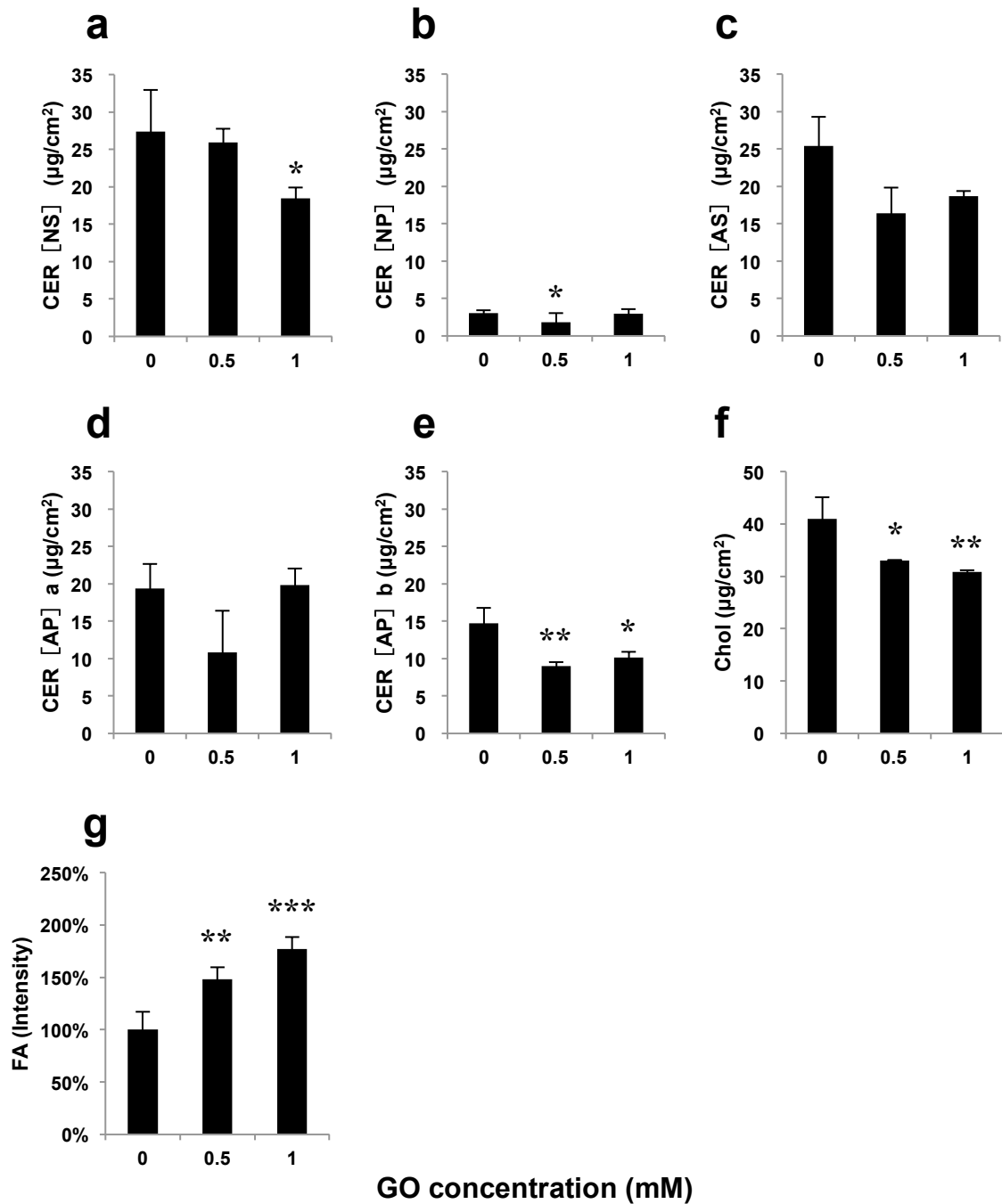


Figure 4. Changes in the content of epidermal lipids in immature reconstructed epidermal model

Lipids content of immature reconstructed epidermal model was determined after 72 h-exposure to glyoxal by HPTLC: CER[NS] (a), CER[NP] (b), CER[AS] (c), CER[AP]a (d), CER[AP]b (e), Chol (f), FA (g).

All results are expressed as the mean \pm S.D. of $n = 3$ replicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Dunnett's test (vs. 0 mM).

3-3. 脂質代謝関連遺伝子発現量の測定

成熟・幼若両糖化表皮において増加が認められた脂肪酸の増加の原因を明らかにするため、HaCaT 細胞を用いて脂質代謝に関連する遺伝子の発現量の調査を行った。1.25 mM GO に 30 分間暴露した HaCaT 細胞を 48 時間培養すると、細胞生存率は 86.2%まで低下し、以降 GO 濃度依存的な減少を示した (Fig. 5a, $p < 0.001$)。細胞内 AGEs 量は、5 mM GO の 30 分間暴露により顕著に増加したことから、HaCaT 細胞の糖化誘導条件としては本条件を採用した。

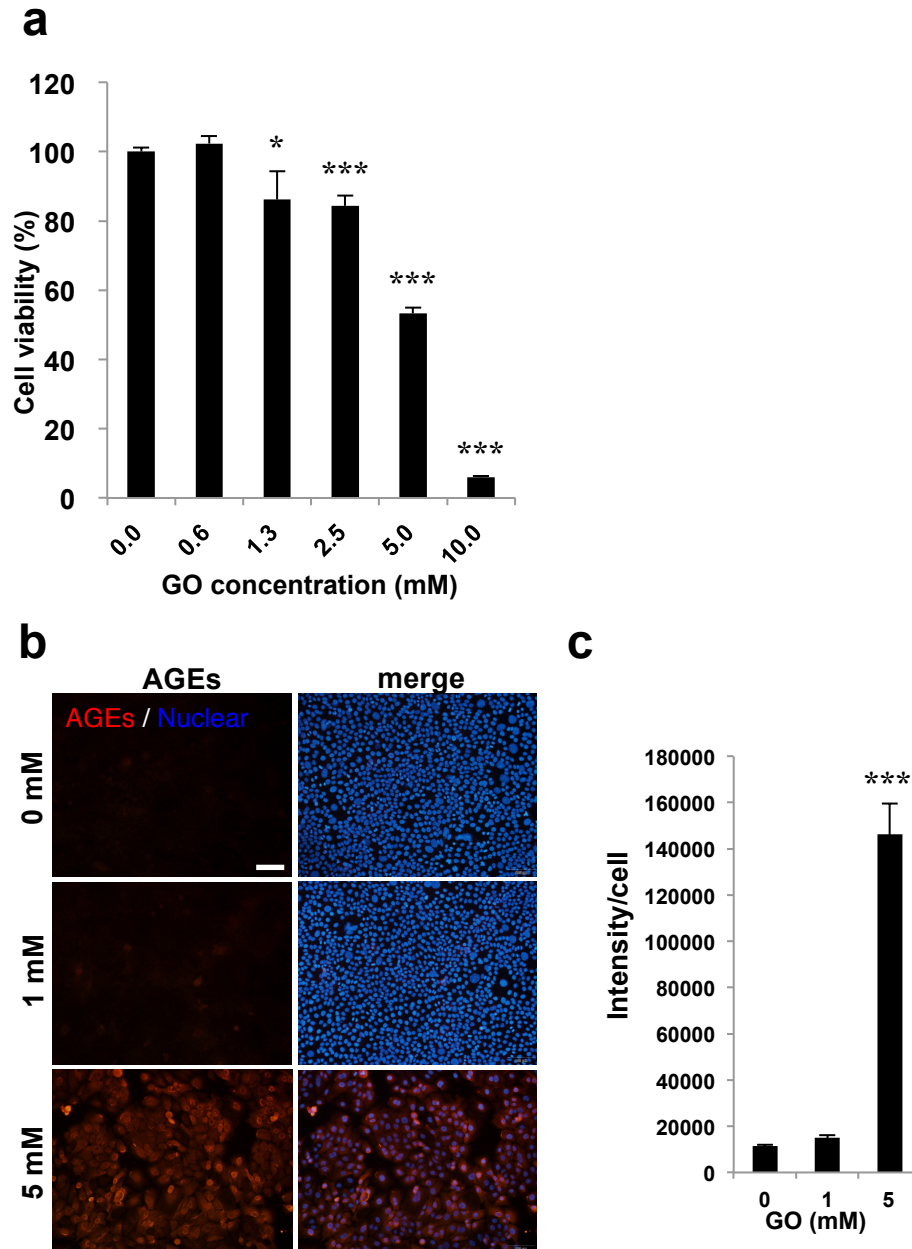


Figure 5. Evaluation of glycation on HaCaT cells

Viability of HaCaT cells determined by MTT assay after 48 h of 30 min-exposure to glyoxal (a). The existence of AGEs was determined by immunohistochemical analysis (b). Intensity derived from AGEs was divided by the cell number, calculated using ImageJ (c). Cell viability is expressed as the mean \pm S.D. of $n = 4$ replicates. The other results are the mean \pm S.D. of $n = 3$ replicates. Bar = 100 μ m. *** $p < 0.001$, Dunnett's test (vs. 0 mM).

上記の条件にて、脂肪酸やセラミドの代謝に関連する酵素群の遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR 法にて測定した。既知の ELOVL ファミリーの遺伝子のうち、ELOVL2 および ELOVL3 の遺伝子発現量は GO 暴露 6 時間後、コントロールと比較し、それぞれ 18.3、8.9 倍に増加した (Figs. 6b & c) (*ELOVL2*: $p < 0.001$, *ELOVL3*: $p < 0.001$)。FAS の遺伝子発現量は、GO 暴露 48 時間後、2.7 倍に増加した (Fig. 6h, $p < 0.05$)。

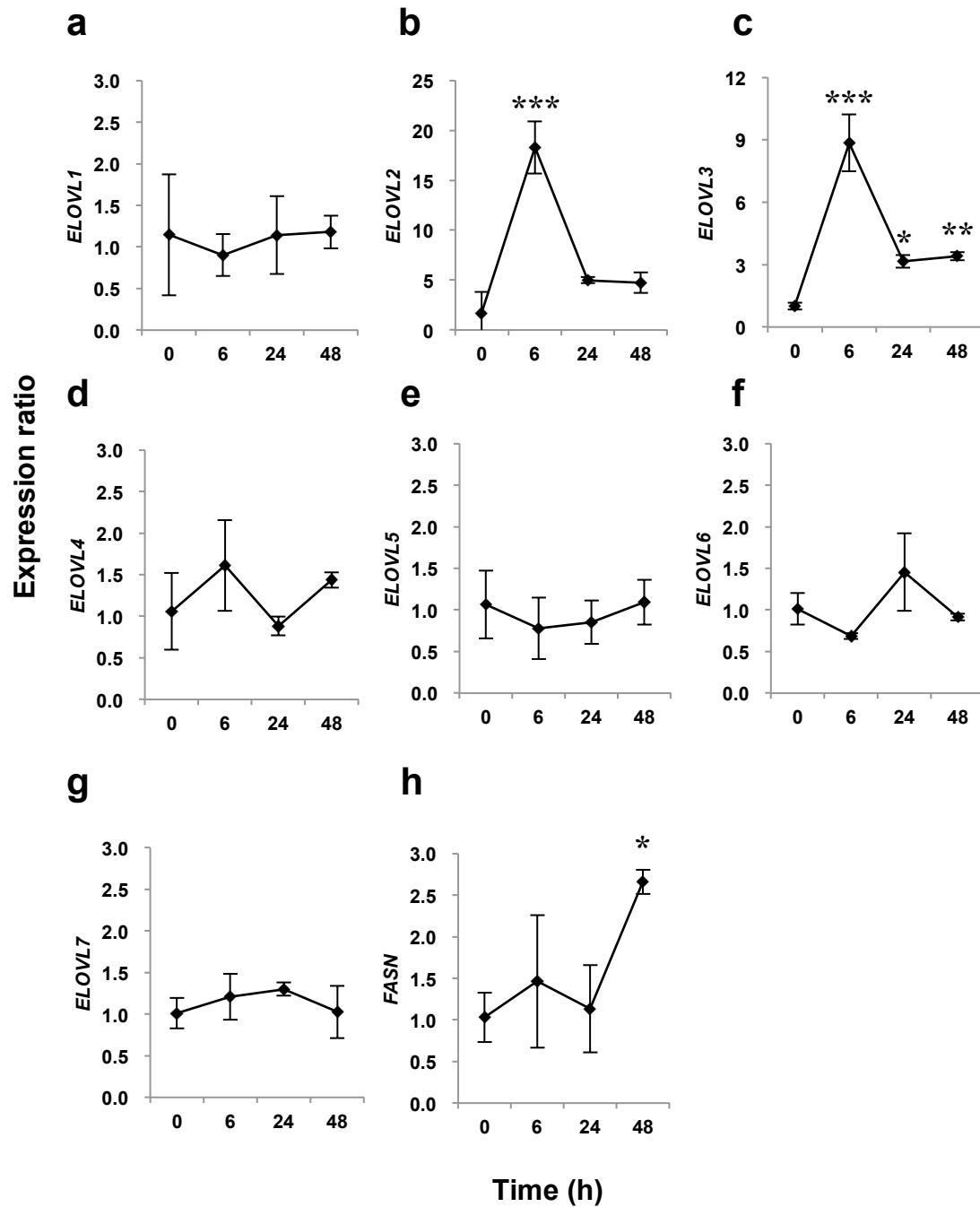


Figure 6. Changes in the expression of fatty acid synthesis related genes

ELOVL1-7 (a-d) and *FASN* (f) expression ratio was determined by real time RT-PCR. All results are expressed as the mean \pm S.D. of $n = 3$ replicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Dunnett's test (vs. 0 h).

CER 合成および分解関連の遺伝子については、CER 生合成の初発律速酵素である SPT1、SPT2、セラミド合成酵素のうち CERS3、CERS4、CER をスフィンゴシンと脂肪酸に分解する酵素である酸性セラミダーゼ aCDase の遺伝子発現量を測定した。特に GO 暴露 24 時間後の CER 合成関連遺伝子に変動が認められ、*SPT2*、*CERS3*、*CERS4* はそれぞれ発現量が 0.60 倍 ($p < 0.05$)、0.48 倍 ($p < 0.01$)、0.55 倍 ($p < 0.05$) となり、有意に減少した (Fig. 7)。

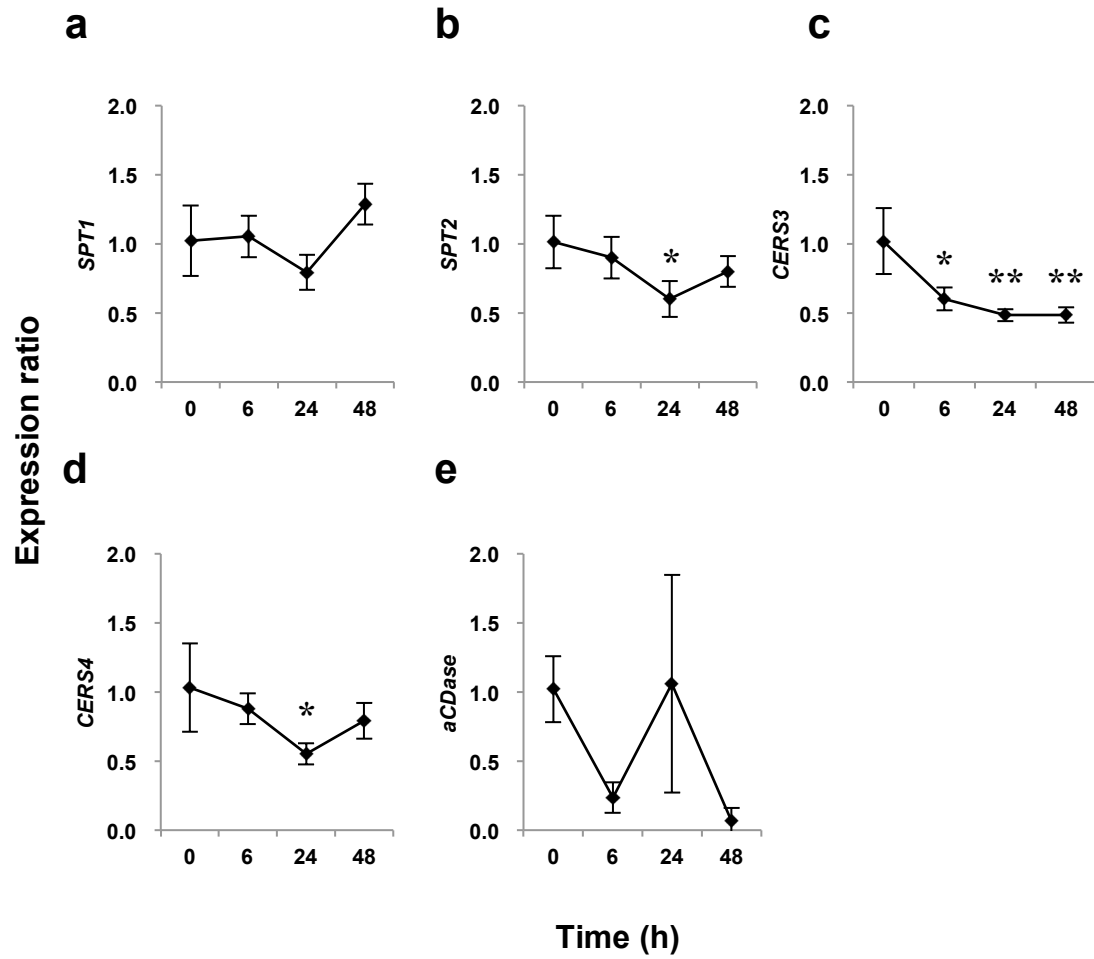


Figure 7. Changes in the expression of ceramide metabolism related genes

SPT1 (a), *SPT2* (b), *CERS3* (c), *CERS4* (d), and *aCDase* (e) expression ratio was determined by real time RT-PCR. All results are expressed as the mean \pm S.D. of $n = 3$ replicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Dunnett's test (vs. 0 h).

3-4. 脂肪酸種の測定

次に、増加した脂肪酸種を調べるため、糖化誘導を行った HaCaT 細胞中の脂肪酸を GC-MS を用いて測定した。正常 HaCaT 細胞から抽出された脂肪酸量は C14:0, C16:0, C18:0, C20:0 がそれぞれ、0.28, 12.7, 10.0, 0.08 $\mu\text{g} / (\text{protein}) \text{mg}$ であったのに対し、糖化 HaCaT 細胞中脂肪酸量はそれぞれ 0.46, 27.9, 21.1, 0.12 $\mu\text{g} / (\text{protein}) \text{mg}$ ($p < 0.05, p = 0.07, p < 0.05, p < 0.05$) であった (Fig. 8)。以上のことから、糖化により増加した脂肪酸は主に飽和脂肪酸であることが示された。

糖化表皮に含まれる脂肪酸の増加、セラミドの減少から、角層細胞間脂質の変化において、両脂質代謝を制御する CERS の関与が予想された。そこで、CERS の阻害剤であるフモニシン B1 (Fumonisin B1: FB1) を適用した際の HaCaT 細胞中脂肪酸量の測定を行った。FB1 は 50 μM まで HaCaT 細胞に毒性を示さなかった (Fig. 9a)。50 μM の FB1 を 48 時間処理した HaCaT 細胞では、コントロールと比較して C18:2 脂肪酸量が有意に増加した ($p < 0.05$) (Fig. 9b)。

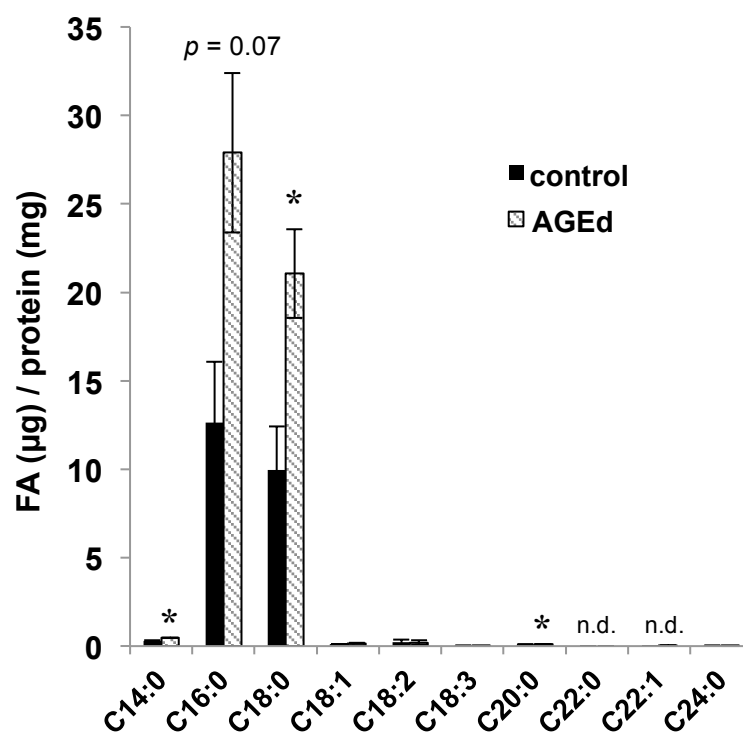


Figure 8. The content of various lengths of FAs

Lipids were extracted from HaCaT cells exposed to 0 mM (control), or 5 mM (AGE-treated) glyoxal for 30 min followed by 48 h incubation. The content of FAs was determined by GC-MS. All results are expressed as the mean \pm S.D. of $n = 3$ replicates. * $p < 0.05$, paired student's t -test.

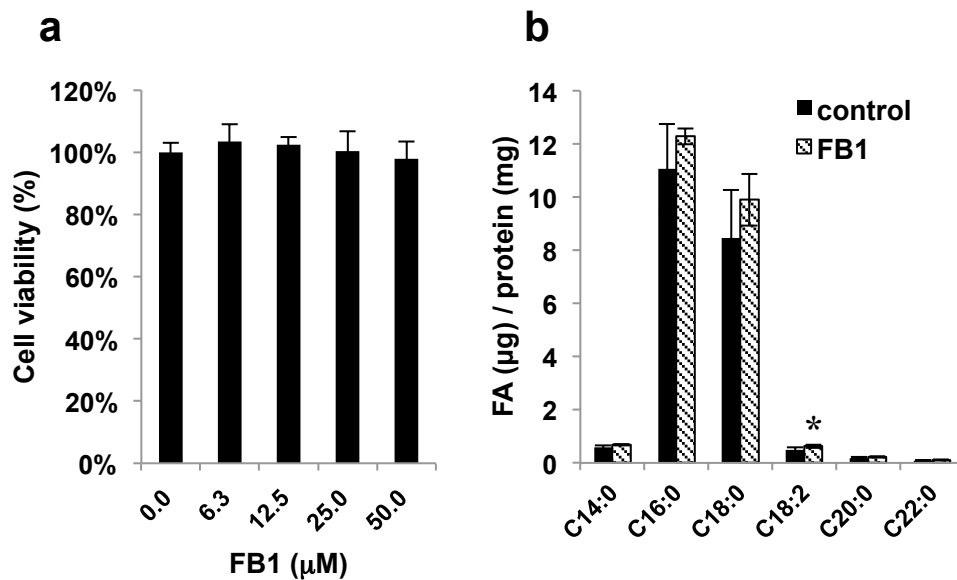


Figure 9. The content of various length of FAs after the treatment of FB1

Viability of HaCaT cells after 48 h-exposure to FB1 determined by alamarBlue® assay (a). Lipids were extracted from HaCaT cells exposed to 0 mM (control), or 50 μM FB1 for 48 h and the content of FAs was determined by GC-MS. All results are expressed as the mean ± S.D. of n = 3 replicates. * $p < 0.05$, paired student's *t*-test.

3-5. 疑似糖化表皮脂質リポソームの物性評価

脂質構成の変化によるラメラ構造の流動性を、SCLL と G-SCLL を作製しその物性を調査することにより評価した。粒子径、Pdl、 ζ 電位に関しては、SCLL、G-SCLL 共に 37°C 条件下では 1 週間安定であった (Fig. 10a-c)。これら SCLL の ESR スペクトルより求めた流動性の指標である秩序度 (S) は、僅かではあるものの G-SCLL において有意に低い値を示し、G-SCLL のラメラ構造は SCLL と比較すると高い流動性を有することが示された (Table 2)。

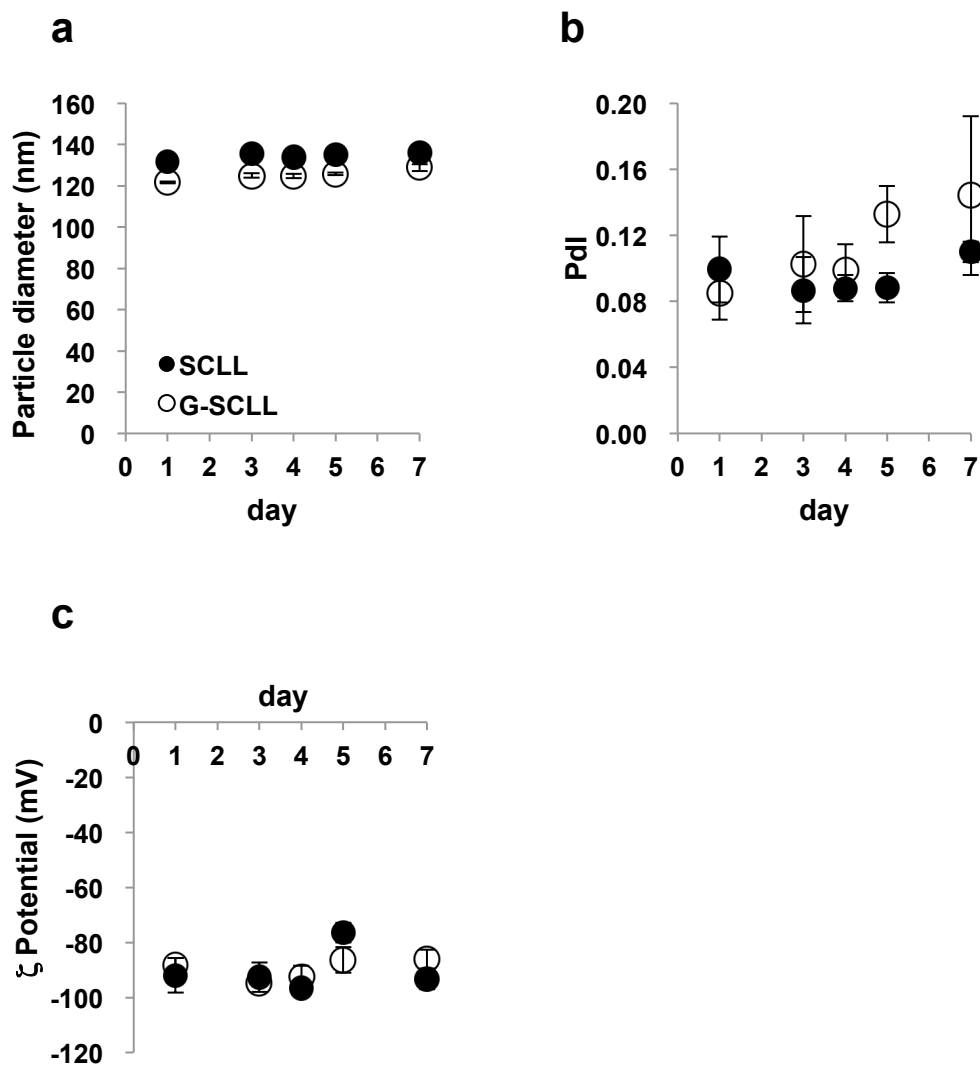


Figure 10. Characterization of liposomes mimicking normal (SCLL) and glycated (G-SCLL) epidermal lipid composition

Time dependent change in the particle diameter (a), PDI (b), and ζ potential (c) of SCLL and G-SCLL at 37°C.

Table 2. Formulation and fluidity of liposomes mimicking normal (SCLL) and glycated (G-SCLL) epidermal lipid composition

	Composition	Ratios by weight	Particle diameter	Pdl	ζ potential	S
SCLL	CER[NS]/Chol/PA/ChoSE	40/40/25/10	131.767 \pm 1.124	0.099 \pm 0.020	-92.000 \pm 6.321	1.364 \pm 0.005
G-SCLL	CER[NS]/Chol/PA/ChoSE	20/20/50/5	121.667 \pm 0.493	0.085 \pm 0.016	-88.200 \pm 2.512	1.316 \pm 0.004*

All results are expressed as the mean \pm S.D. of n = 3 replicates. * $p < 0.05$, paired student's *t*-test.

3-6. 糖化表皮におけるタイトジャンクションの発現

最後に、皮膚第二のバリアである TJ へ表皮の糖化が与える影響を調査するため、糖化誘導成熟三次元培養表皮を用い、TJ を構成する *CLDN1*、*CLDN4*、*OCLDN* の遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した (Fig. 11)。72 時間の GO 暴露を行った三次元培養表皮においては、*CLDN1*、*CLDN4*、*OCLDN* いずれの遺伝子も GO 濃度に依存して発現量は増加傾向にあったが、有意な差は認められなかった (Fig. 11a-c)。1 mM の GO を暴露した三次元培養表皮の 6 時間から 48 時間までの遺伝子発現量は、*CLDN1* は 24 時間と 48 時間、*CLDN4* は 48 時間において有意な発現の増加が認められた (*CLDN1*: $p < 0.05$, *CLDN4*: $p < 0.01$) (Fig. 11d-f)。

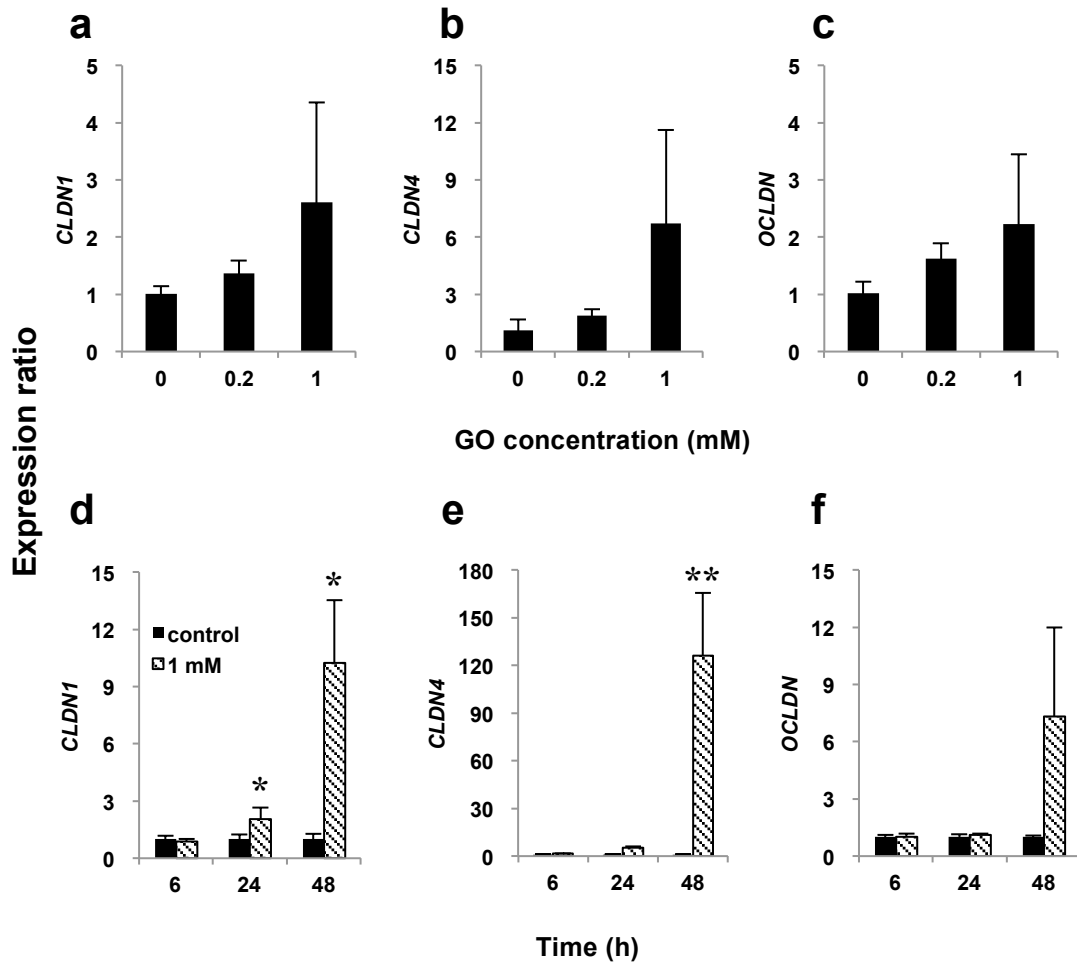


Figure 11. Expression of tight junction related genes in reconstructed epidermal model

GO concentration dependent change in the expression of *CLDN1* (a), *CLDN4* (b), and *OCLDN* (c) after 72 h-exposure to glyoxal. Time dependent change in the expression of *CLDN1* (e), *CLDN4* (f), and *OCLDN* (g). Expression ratio was determined by real time RT-PCR. All results are expressed as the mean \pm S.D. of n = 3 replicates. * p < 0.05, ** p < 0.01, paired student's t -test.

第4節 考察

本章では、糖化が表皮脂質の量やその代謝、バリア機能に与える影響を調査するため、成熟三次元培養表皮、幼若三次元培養表皮および培養表皮角化細胞を用いて評価を行った。成熟三次元培養表皮は、正常状態からの糖化ストレスを模倣するモデルとして、幼若三次元培養表皮は成熟した角層を有さないため、糖化ストレスを受けた表皮細胞から生成される角層を有する、慢性化したモデルとして使用した。

成熟三次元培養表皮では、脂肪酸の増加のみが観察されたが、幼若三次元培養表皮ではこれに加え、CER [NS] および Chol の減少が観察された (Fig. 4)。三次元培養表皮ではターンオーバーに伴う角層の剥離は起こらない。成熟糖化表皮においてセラミドやコレステロールの減少が見られなかったのは、既に正常な分化の過程で生成されたセラミドにより、糖化誘導後のセラミド産生量の低下がマスクされているためであると考えられる。これまで、角層細胞間脂質の構成比率や構成成分と皮膚疾患の関連について数多くの報告がされている。例えば、AD 患者においては、三種の主要な角層細胞間脂質は全て減少している⁴⁵⁻⁴⁸⁾。さらに、セラミドの前駆体および代謝産物であるスフィンゴイド塩基、スフィンゴシンおよびスフィンガニンの構成比率の変化により、ラメラ構造が変化しバリア機能の低下に寄与することが知られている⁴⁹⁾。皮膚の老化に関しては、Kim らが、ヒト皮膚において自然老化や光老化により脂肪酸合成が低下することを報告しているが^{50, 51)}、これは糖化皮膚により得られた脂質量の変動と

は逆の挙動である。今後さらなる解析が必要であるが、それぞれの病態に特徴的な脂質代謝異常が見られることは、糖化に特異的な脂質代謝の存在を示唆している。

また、脂肪酸増加のメカニズムを解明するため、代謝関連遺伝子の測定を実施したところ、ELOVL2、ELOVL3 および FAS の遺伝子発現量が有意に増加した (Fig 6)。C16 までの脂肪酸は FAS の複合体により合成され、ELOVL ファミリーの酵素はこれを伸長する役割を担う。ELOVL は現在まで 1 から 7 のホモログが存在することが報告されているが、中でも皮膚における発現は ELOVL3 と ELOVL4 が多い^{52,53)}ことから、表皮角化細胞における脂肪酸増加への寄与は FAS と ELOVL3 が主であると予想される。これに加え、表皮顆粒層においては、脂肪酸はホスホリパーゼ A₂ (Phospholipase A₂: PLA₂) によるリン脂質の分解により生じ、皮膚の pH の維持に寄与していると考えられている⁵⁴⁾。本実験系においては、GO 処理 HaCaT 細胞に PLA₂ の阻害剤である 4-bromophenacyl bromide (BPB) を添加しても、顕著な脂肪酸量の変化は認められなかった (data not shown)。また、PLA₂ は生体膜の主要構成成分であるグリセロリン脂質 sn-2 位のアシル鎖を加水分解し、遊離脂肪酸とリゾリン脂質を産生するが、sn-2 位の脂肪酸は不飽和脂肪酸であることから、糖化による脂肪酸合成は PLA₂ を介さないものと予想される。

CERs 量の減少に関しては、SPT2、CERS3、CERS4 の遺伝子発現量の低下が確認されたため、慢性的な糖化による転写レベルの *de novo* CER 合成の低下が一

因であると考えられる (Figs 7)。CERS はスフィンゴ脂質の *de novo* 合成だけでなく、スフィンゴシンの再利用によるスフィンゴ脂質の合成にも携わり、間接的に脂肪酸を消費するため、セラミド合成にとって非常に重要であると考えられている。6 種類の CERS ホモログのうち、CERS3、CERS4 は皮膚に存在する⁵⁵⁾。CERS3 のノックアウトマウスでは 90%もの表皮脂質が喪失していること⁵⁶⁾、CERS 阻害剤である FB1 の単独処理によって、有意ではないものの HaCaT 細胞中の飽和脂肪酸含有量の増加が認められた (Fig. 9) こと、aCDase の発現量に有意な減少が認められなかったこと (Fig. 7) から、CERS は糖化皮膚においても脂肪酸の増加およびセラミド量の減少に対する寄与が大きいものと推察された。

HaCaT 細胞への GO 処理によって増加したのは C16、C18 の飽和脂肪酸であった (Fig. 8)。CERS と ELOVL3 は飽和脂肪酸に対し基質特異性を有する。CERS3 は、C16:0、C18:0、C22:0、C24:0 および >C26 であり⁵⁷⁾、ELOVL3 は C18:0、C20:0、C22:0、C24:0 である⁵⁵⁾。この選択性が、飽和脂肪酸の蓄積の一因であると考えられる。

重要な課題として、FASN と ELOVL の上流の経路の解明が挙げられる。糖やその代謝物への過剰な暴露は、多くの細胞において脂質合成を誘導し、それを制御する分子としては Lipid synthesis including liver X receptors (LXR)、Sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c)、そして Carbohydrate response element binding protein (ChREBP) transcription factors 等が知られている^{58, 59, 60)}。皮膚におけるこれらの分子の寄与は検討の余地があるが、同様の機構で制御され

ている可能性は高いと考えられる。

また、 $\Delta TEWL$ 値の低下、すなわちバリア機能の低下が起こったメカニズムとして、FA の増加や CER、Chol の減少に伴う角層細胞間脂質の物性変化が予想された。脂質組成の変化によりラメラの流動性は変化するため⁶¹⁾、表皮細胞に含まれる脂肪酸の比率が角層細胞間脂質まで反映されているのであれば、バリア機能へ与える影響は大きいと推測される。実際に糖化皮膚の角層細胞間脂質組成を模倣した SCLL は膜流動性が増加したことから、糖化皮膚では角層細胞間脂質の膜流動性の変化がバリア機能低下の一因であると考えられた。その他の要因として、糖化した HaCaT 細胞の細胞毒性によるバリア機能の低下の可能性が挙げられる。FA によって誘導されるアポトーシスは主に C16:0、C18:0 の飽和 FA によって引き起こされることが報告されており、C4:0-C14:0 の飽和 FA や不飽和 FA では起こらないとされている^{62, 63)}。Listenberger らの報告では、CHO 細胞において C16:0 FA 誘導アポトーシスは、細胞死誘導性脂質であるセラミドの合成ではなく細胞内 ROS 量の増加によるものと考察されている³⁰⁾。本実験の条件に合わせ、HaCaT 細胞に GO を添加した直後の細胞内 ROS 量を測定したところ、顕著な増加は認められなかった (data not shown)。また、成熟モデルにおいてはセラミド量には変化は認められず、未熟モデルではむしろ減少したことから (Fig. 4)、慢性的な糖化状態にある皮膚と初期糖化状態の皮膚いずれも ROS やセラミド量の増加以外のメカニズムで細胞死を起こしている可能性が考えられる。

さらに、皮膚第二のバリアである TJ を形成する CLDN1、CLDN4、OCLDN、の遺伝子発現量を調査すると、糖化を誘導することにより有意に増加した (Fig. 11)。TJ の機能の発現にはタンパク質量や分布が重要であるため、免疫蛍光染色等による評価を行う必要性はあるが、角層のバリア機能の低下を感知し、相補するために発現量が上昇している可能性も考えられる。

以上、本章の検討より得られた新たな知見として、糖化による皮膚の角層細胞間脂質代謝異常が、皮膚バリア機能の低下の一因となる可能性が示された (Fig. 12)。

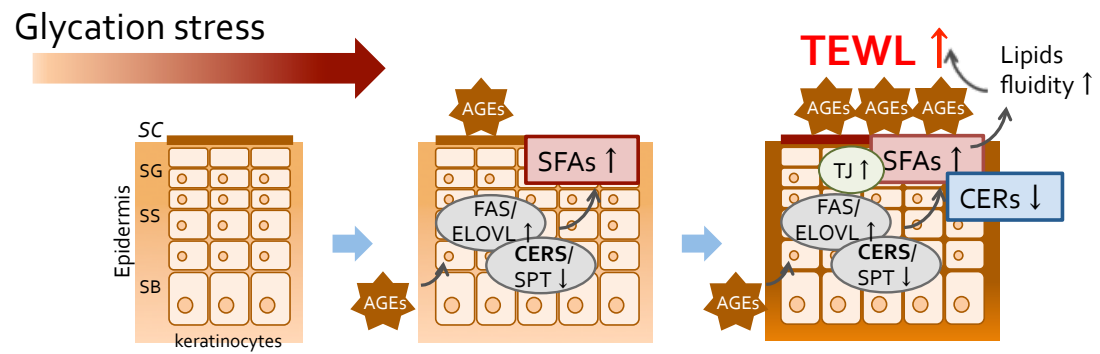


Figure 12. The effect of glyoxal induced glycation on epidermal lipids synthesis and barrier function

SFAs: Saturated fatty acids

第 2 章

糖化表皮における化合物透過性の変化

第 1 節 緒論

化合物の吸収ルートとして、皮膚はその非侵襲性や、投与コントロールの簡便性、肝初回透過効果を回避できるという代謝上の利点から重要な位置づけをされている。一方、昨今の高齢化に伴い、多様な状態の皮膚に対する化合物の適用の機会が増えている。皮膚は自然老化や紫外線暴露による光老化、さらにはアトピー性皮膚炎（Atopic dermatitis: AD）や乾癬などの疾病において、組織学的に大きく変化することは周知の事実であるものの、これまでのところその影響は化合物の経皮適用に加味されていない。角層は角質細胞と、角層細胞間脂質より構成されるため、脂溶性の化合物の透過性が高く、またおよそ 500 Da 以上の化合物の透過性は低いという特徴を有する⁶⁴⁾。このことから、特に水溶性高分子化合物を透過させたい場合においては、物理的（マイクロニードル、サーマルアブレーション、マイクロダーマブレーションイオントフォoresis、ソノフォoresis）・化学的（吸収促進剤）な方法を用いて皮膚最大の透過バリアである角層を突破し、皮内および体循環へ化合物を送達する試みがなされている²⁻⁴⁾。

AGEs は、前述の通り、皮膚において多くの炎症性の生理学的変化を誘導し、構造タンパク質の変性を引き起こすことから糖化皮膚では化合物の透過性が変化していると予想されるが、詳細な透過プロファイルは明らかとなっていない。

そこで本章では、摘出マウス皮膚を用いて糖化皮膚モデルを作製し、*in vitro* における化合物の透過、浸透挙動の評価に用いた。本モデルは黄色化や表面のシワ等の皮膚の老化に特徴的な変化を示すことを確認し、化合物の透過性を評価した。モデル化合物は、 $\text{Log } K_{ow}$ と分子量を考慮して選択した。親水性化合物として分子量 376.28 のフルオレセインナトリウム (sodium fluorescein: FL-Na)、分子量約 4,000 のフルオレセインイソチオシアナートデキストラン (fluorescein isothiocyanate-dextran: FD-4) の透過量を、疎水性化合物として分子量 318.37 のナイルレッド (Nile red) の透過量を調査した。さらに、化合物の皮膚浸透過程の観察、および角層除去皮膚を用いた化合物透過試験を行い、糖化皮膚を介した化合物透過に対する角層の寄与について考察した。

第 2 節 実験方法

2-1. 実験動物

7～9 週令の雄性ヘアレスマウス（Hos: HR-1）は株式会社星野試験動物飼育所（茨城、日本）より購入した。飼料および水は自由摂取とした。動物実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾を得て、城西大学動物実験規定に従い行った。

2-2. 試薬および実験材料

グアニジン塩酸塩、sodium fluorescein および Nile red は和光純薬工業株式会社より購入した。fluorescein isothiocyanate-dextran (average M.W. 4,000) は Sigma より購入した。Glyoxal、抗 AGEs 抗体、メタノールは第一章と同じものを使用した。

2-3. マウス皮膚の糖化誘導

マウスを頸椎脱臼により屠殺後、皮膚を剥離し、脂肪等の皮下組織を取り除き、皮膚をフランチセル（有効透過面積：1.77 cm²、レセプター容積：5 mL）に角層が上になるよう装着した。レセプター溶液として 5 mL の PBS(-)（コントロール）、種々濃度の GO 含有 PBS(-)（AGEd）および GO と糖化阻害剤であるグアニジン塩酸塩を含む PBS(-)を適用し、24 時間、糖化誘導と水和を行った。その間、フランチセル内は、セル中の攪拌子をマグネティックスターラーによって回転させることにより攪拌し、皮膚温度は 32°C に維持した。角層除去皮膚に

については、15 回のテープストリップ処理を施した後に、上記の処理を行うことにより糖化誘導と水和を行った。

2-4. 透過試験

2-3 で得られたコントロールおよび AGEd モデルの皮膚をフランツセルに装着したまま、水和および糖化誘導に使用したレセプター溶液を回収した。透過試験で用いるレセプター溶液で皮膚およびフランツセルを洗浄した後、5 mL のレセプター溶液を再度充填し、透過試験を行った。全層皮膚を介する透過試験においては、ドナー溶液として 1 mM FL-Na と 0.3 mM Nile red の 50%メタノール水溶液を、レセプター溶液として 50%メタノール水溶液を使用した。角層除去皮膚を用いた透過試験においては、ドナー溶液として 1 mM の FL-Na と 0.25 mM の FD-4 の PBS(-)溶液を、レセプター溶液として PBS(-)を使用した。ドナー側には 1.5 mL の試験溶液を適用し、適用した時間を 0 時間とした。フランツセル内は、セル中の攪拌子をマグネティックスターラーによって回転させることにより攪拌した。1 時間ごとに 300 μ L のレセプター溶液を回収し、同量の新しい溶液に置き換えた。透過した FL-Na と FD-4 量は、Ex: 490 nm/Em: 520 nm の条件にて、Nile red 量は、Ex: 570 nm/Em: 650 nm の条件にてマイクロプレートリーダー (SpectraMax M2[®]) を用い測定し、希積分を補正して皮膚透過量を算出した。

2-5. 化合物の皮膚透過量の解析

作製したモデル皮膚を介した各化合物の透過性は、定常状態における化合物の皮膚透過速度 (Flux) の比を指標に比較した (Eq. 3)。Flux は、4 時間から 6 時間における各化合物の累積透過プロファイルから算出した。

Eq. 3

$$\text{Flux ratio}_{\text{AGED/normal}} = \text{Flux}_{\text{AGED}} / \text{Flux}_{\text{normal}}$$

$$\text{Flux ratio}_{\text{FD4/FLNa}} = \text{Flux}_{\text{FD4}} / \text{Flux}_{\text{FLNa}}$$

Flux_{AGED}: 糖化モデル皮膚を介した各化合物の累積透過量から算出した Flux

Flux_{normal}: コントロール皮膚を介した各化合物の累積透過量から算出した Flux

Flux_{FD4}: 角層除去コントロール皮膚を介した FD4 の累積透過量から算出した Flux

Flux_{FL-Na}: 角層除去コントロール皮膚を介した FL-Na の累積透過量から算出した Flux

2-6. 糖化指標の測定および皮膚中化合物量の測定

AGEs 誘導後、皮膚を水洗し 50%メタノール水溶液中で眼科ハサミを用いて切断し、20 分間の超音波処理を行った。20,000×g、15 分の遠心後、上清を回収し、Ex: 365 nm/Em: 450 nm における AGEs 由来の自家蛍光を測定した。

皮膚中化合物量は、各化合物適用後 6 時間の皮膚に同様の処理を行い、2-4 に示した波長において蛍光を測定し、同条件で作成した検量線により定量した。

2-7. 皮膚計測

皮膚色の測定

皮膚色は、マウス摘出皮膚を白板の上に置き、角層側よりプローブをあて、第一章と同様の方法で測定した。

皮膚表面形状の測定

皮膚の表面形状は、光学三次元皮膚測定装置 PRIMOS[®] (GFMesstechnik GmbH, Teltow, Berlin, Germany) を用いて測定した。表面粗さは、ISO 標準表面粗さパラメータである Ra (算術平均粗さ)、Rz (十点平均粗さ)、Ry (最大高さ) を指標とし、評価に用いた。

2-8. 免疫蛍光染色

皮膚は、OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン株式会社、東京、日本) に包埋し、液体窒素で凍結させた後、-80℃で保存した。8 μm 厚の薄切切片を作製し、流水洗にて洗浄後、冷メタノールで-30℃、15 分間処理することにより組織を固定した。1% BSA/PBS(-)溶液で室温、1 時間反応させることによりブロッキングを行った。1 次抗体は、抗 AGEs 抗体を Can Get Signal immunostain[®] Solution A (東洋紡株式会社、大阪、日本) に 1/200 で希釈し、4℃、オーバーナイトで反応させた。結合した抗体を Alexa546 標識の 2 次抗体 (1/200、抗体/Can Get Signal immunostain[®] Solution A) で室温、1 時間処理することにより可視化した。洗浄後、Hoechst33258 (株式会社同仁化学研究所、熊本、日本) で核染色を

施した後、倒立顕微鏡 IX71（オリンパス株式会社、東京、日本）を用いて蛍光観察を行った。

2-9. 角層サンプルの調製および染色

角層染色用のヘアレスマウスの角層は、植物性セロハンテープ（ニチバン株式会社、東京、日本）を用いたテープストリップ法により、第一層を採取した。角層サンプルはスライドグラス上に貼り付け、キシレン中オーバーナイトで浸漬させることによりテープを溶解させた。エタノールで洗浄、乾燥後、2-8 で示した免疫蛍光染色法により角層の AGEs を検出した。

2-10. 統計処理

データは mean \pm S.D. で表し、SAS statistics software version 9.2（SAS Institute, Cary, NC, U.S.A.）、もしくは Microsoft excel 2011（Redmond, WA, U.S.A.）を用いて統計処理を行った。危険率 5%未満（* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ）を有意差ありとした。

第 3 節 結果

3-1. *In vitro* 糖化皮膚モデルの特性評価

正常皮膚と糖化表皮における化合物の皮膚透過性の違いを明らかにするため、マウス摘出皮膚をフランチセルに挟み糖化皮膚を作製し、それを介する化合物の透過性から評価を行った。本モデルでは、GO を含む溶液をレセプター側へ適用して、生体において真皮側より起こる糖化を模倣している。Fig. 13a には AGEs を免疫蛍光染色したときの結果を示す。10 mM GO に 24 時間暴露した皮膚では、皮膚全層に AGEs が蓄積し、50 mM GO に 24 時間暴露した皮膚では、角層中に AGEs が存在していることが確認された。

また、AGEs 蓄積の指標として、糖化誘導直後のレセプター溶液の Ex: 365 nm/Em: 450 nm における蛍光を測定すると、強度は GO 濃度依存的に有意に増加した。すなわち、GO 濃度に依存して蛍光 AGEs の増加が確認された ($p < 0.001$)。一方、糖化阻害剤であるグアニジン塩酸塩の共存下では減少した ($p < 0.05$) (Fig. 13b)。同様に皮膚ホモジネート中の蛍光値を測定すると、GO 濃度依存的な強度の増強は認められたものの、グアニジン塩酸塩の有無による有意な変化は認められなかった (Fig. 13c)。

次に、皮膚における糖化の特徴的な性質である黄色化やシワの形成を評価するため、皮膚状態の計測を行った。黄身の指標である b^* 値は、GO 濃度依存的に増加し (10 mM: $p < 0.01$, 50 mM: $p < 0.001$)、阻害剤の共存下では減少傾向を示した (Fig. 14a)。表面形状の測定から、*in vitro* の皮膚糖化により表面粗さの

指標 (Ra, Rz, Ry) は大きくなる傾向が観察されたが、有意な差は認められなかった (Fig. 14b & Table 3)。

また、水分蒸散に対するバリアの指標として、糖化モデル皮膚の TEWL 値をフランチセル上で測定した。 b^* 値の上昇に伴い、TEWL の値は高くなったが、有意な相関性は認められなかった ($r = 0.47$) (Fig. 15)。

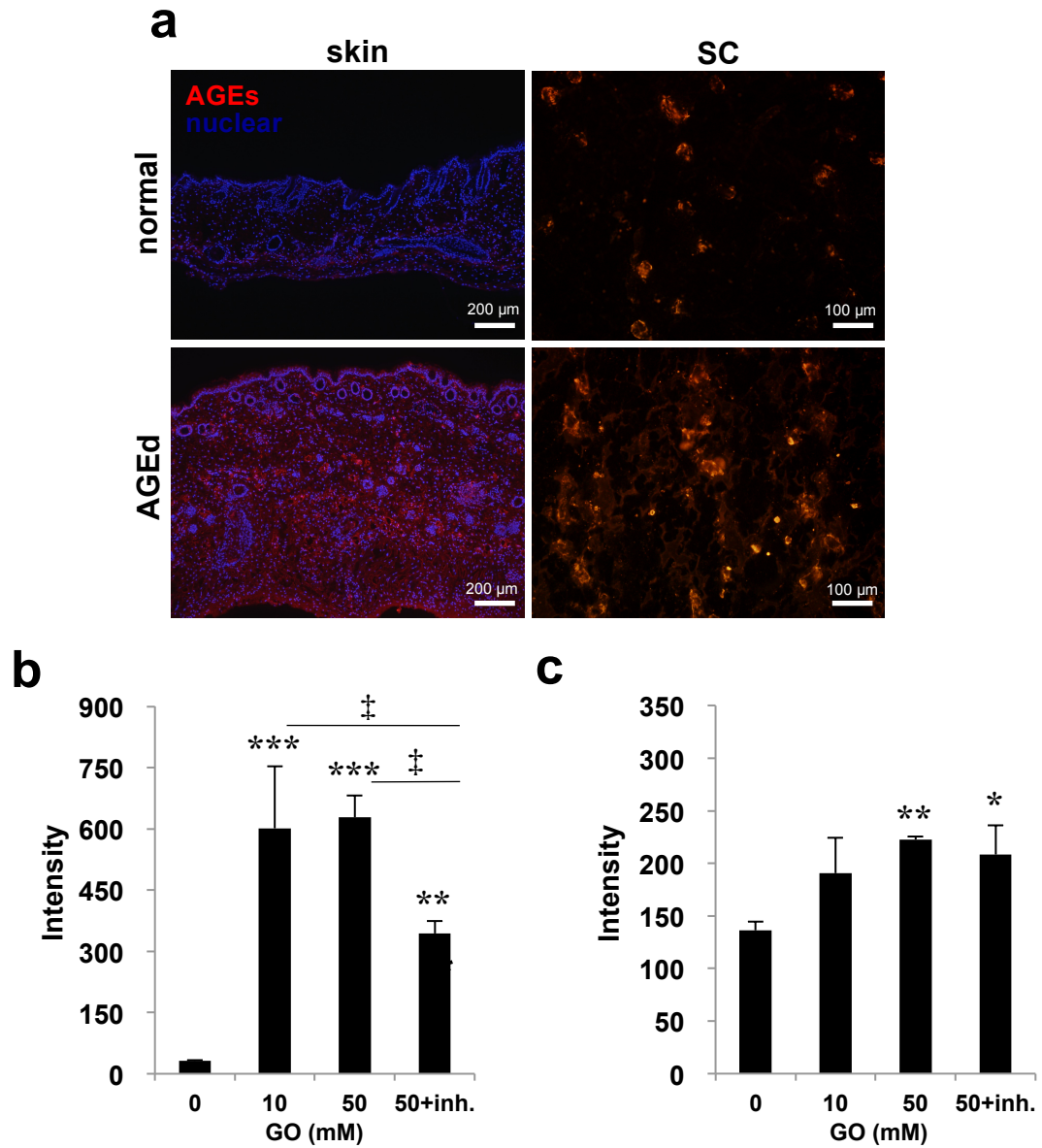


Figure 13. Confirmation of glycation in an *in vitro* glycated skin model

Immunohistochemistry of skin and SC with anti-AGEs antibody. Glycation was induced by hydration with 0 mM GO (normal) or 10 mM (for skin), 50 mM (for SC) of GO (AGED) in PBS at 32°C for 24 h (a). Intensity of fluorescence (Ex: 365 nm/Em: 450 nm) in receptor fluids (b) and skin homogenates (c). Glycation was induced by hydration with the indicated concentration of GO and inhibitor (inh.) in PBS at 32°C for 24 h. All results are expressed as the mean \pm S.D. of $n = 3$ replicates. * $p < 0.05$, ‡ $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Tukey's test.

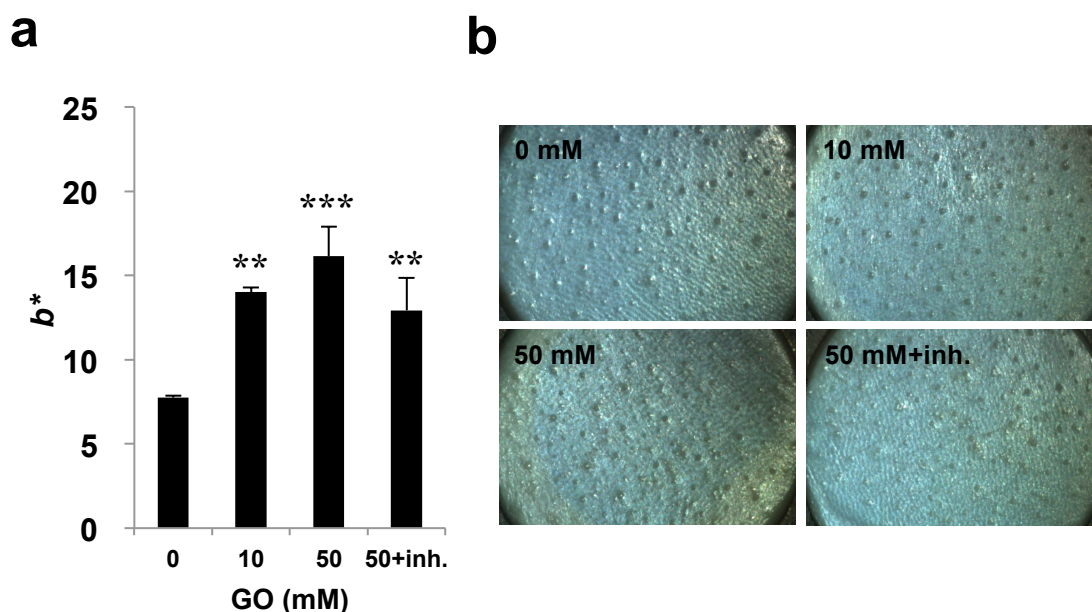


Figure 14. Macroscopic properties of *in vitro* glycated skin model

Yellowish color change was evaluated by colorimetry and expressed in b^* . Glycation was induced by hydration with indicated concentration of GO and inhibitor (inh.) in PBS at 32°C for 24 h. (a). Surface appearance of glycated skin after 24 h incubation under the indicated conditions (b). All results are expressed as the mean \pm S.D. of $n = 3$ replicates. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Tukey's test.

Table 3. Surface profilometry of the *in vitro* glycated skin model

	0 mM	10 mM	50 mM	50 mM+inh.
Ra	8.2 ± 0.4	9.7 ± 1.5	9.6 ± 0.1	9.0 ± 0.2
Rz	42.5 ± 2.1	47.5 ± 8.1	47.6 ± 0.5	44.8 ± 1.7
Ry	61.4 ± 8.8	67.0 ± 17.8	63.6 ± 3	62.6 ± 6.3

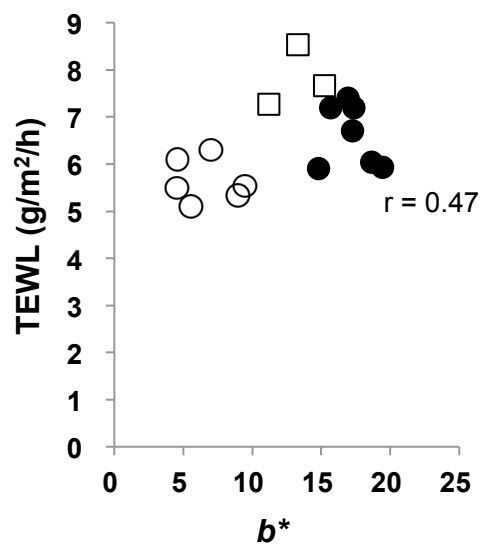


Figure 15. TEWL and b^* values of *in vitro* glycated skin model

In vitro glycated skin model was prepared by exposure to 0 mM (○), 10 mM (□), 50 mM (●) of glyoxal.

3-2. 低分子化合物の糖化皮膚透過性の評価

親水性低分子モデル化合物として FL-Na (M.W. 376.28) を、疎水性低分子モデル化合物として Nile red (M.W. 318.37) を選択した。糖化皮膚においては FL-Na の累積透過量は有意に増加した ($p < 0.05$) (Fig. 16a)。正常皮膚における FL-Na の Flux に対する糖化皮膚の Flux 比 (Flux ratio_{AGED/normal}) は 2.09 であり、糖化皮膚の Flux は正常皮膚と比較し有意に増加した ($^{\#}p = 0.05$) (Fig. 16a, Table 4)。一方、Nile red の Flux ratio_{AGED/normal} は 0.98 であり、両皮膚の Flux に有意な差は認められなかった (Fig. 16b, Table 4)。適用後 6 時間における皮膚中の FL-Na 量は、正常皮膚と糖化皮膚で有意な差は認められなかった (Table 4)。

Table 4. Parameters of skin permeation across the *in vitro* glycated skin model

Skin	Compounds	Condition	Flux (nmol/cm ² /h)	Flux ratio (AGED/normal)	Contents in skin (nmol/cm ²)
Full-thickness	FL-Na	normal	0.03 ± 0.01	-	2.70 ± 0.54
		AGED	0.06 ± 0.01 [#]	2.09	2.22 ± 0.22
	Nile red	normal	2.48 ± 0.41	-	4.99 ± 1.27
		AGED	2.43 ± 0.61	0.98	4.37 ± 0.52
Viable epidermis-dermis	FL-Na	normal	98.00 ± 7.59	-	5.99 ± 1.34
		AGED	62.44 ± 14.48 [*]	0.64	4.64 ± 1.11
	FD4	normal	1.76 ± 0.27	-	6.03 ± 0.95
		AGED	0.71 ± 0.09 ^{**}	0.40	2.60 ± 0.85 [*]

Flux ratio_{AGED/normal} means: Flux across glycated skin / Flux across normal skin. [#]*p* = 0.05, ^{*}*p* < 0.05, ^{**}*p* < 0.01, paired student's *t*-test.

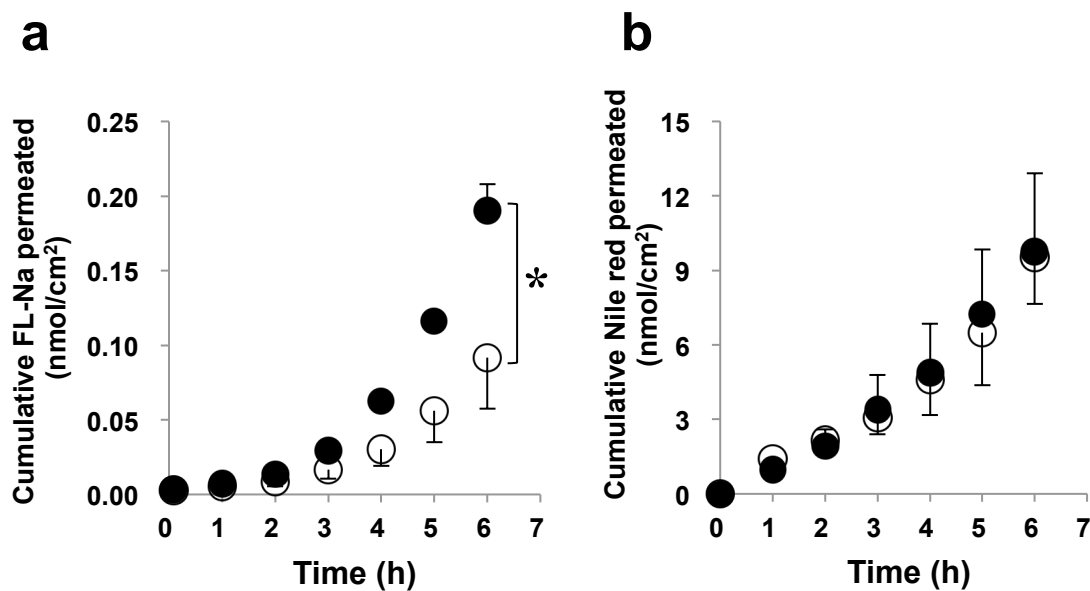


Figure 16. Permeation of low molecular weight molecules across full-thickness glycated skin

Cumulative amount of FL-Na (a) and Nile red (b) permeating across full-thickness normal (○) and AGEd (●) skin. 1 mM of FL-Na or 0.3 mM of Nile red in 50% methanol was used as the donor solution. 50% methanol was used as the receptor solution. All results are expressed as the mean \pm S.D. of $n = 3$ replicates. $*p < 0.05$, paired student's t -test.

3-3. 糖化皮膚における化合物の浸透性・透過性に対する角層の寄与

皮膚最大のバリアである角層に対して糖化が与える影響を明らかにするため、FL-Na の角層への浸透および角層を除去した糖化皮膚モデルを介した化合物透過性の評価を行った。糖化皮膚モデルに FL-Na を適用後 0、1、6 時間で皮膚を回収し、蛍光顕微鏡観察を行った。適用後 1 時間で正常皮膚、糖化皮膚共に FL-Na の角層への移行が確認されたが、糖化皮膚モデルではより高い強度を示し、角層からの距離が離れた部分においてもより多くの FL-Na の存在が観察された。6 時間後、正常皮膚と糖化皮膚モデルの差は小さくなったものの、糖化皮膚では高い浸透性を示した (Figs 17a & b)。

テープストリッピングを 15 回実施することにより角層を除去した皮膚を介した FL-Na の透過性は、全層皮膚のおよそ 3,300 倍となった (Fig. 18a, Table 4)。全層皮膚とは対照的に、角層除去皮膚における FL-Na の Flux ratio_{AGED/normal} は 0.64 となり、糖化皮膚の Flux は正常皮膚と比較し有意に減少した ($p < 0.05$) (Fig. 18a, Table 4)。同様に FD-4 (average M.W. 4,000) の Flux ratio_{AGED/normal} は 0.40 となり、糖化皮膚の Flux は正常皮膚と比較し有意に減少した ($p < 0.01$) (Fig. 18b, Table 4)。また、FD-4 適用後 6 時間における皮膚中の FD-4 量は、糖化皮膚において有意に減少した ($p < 0.05$) (Table 4)。

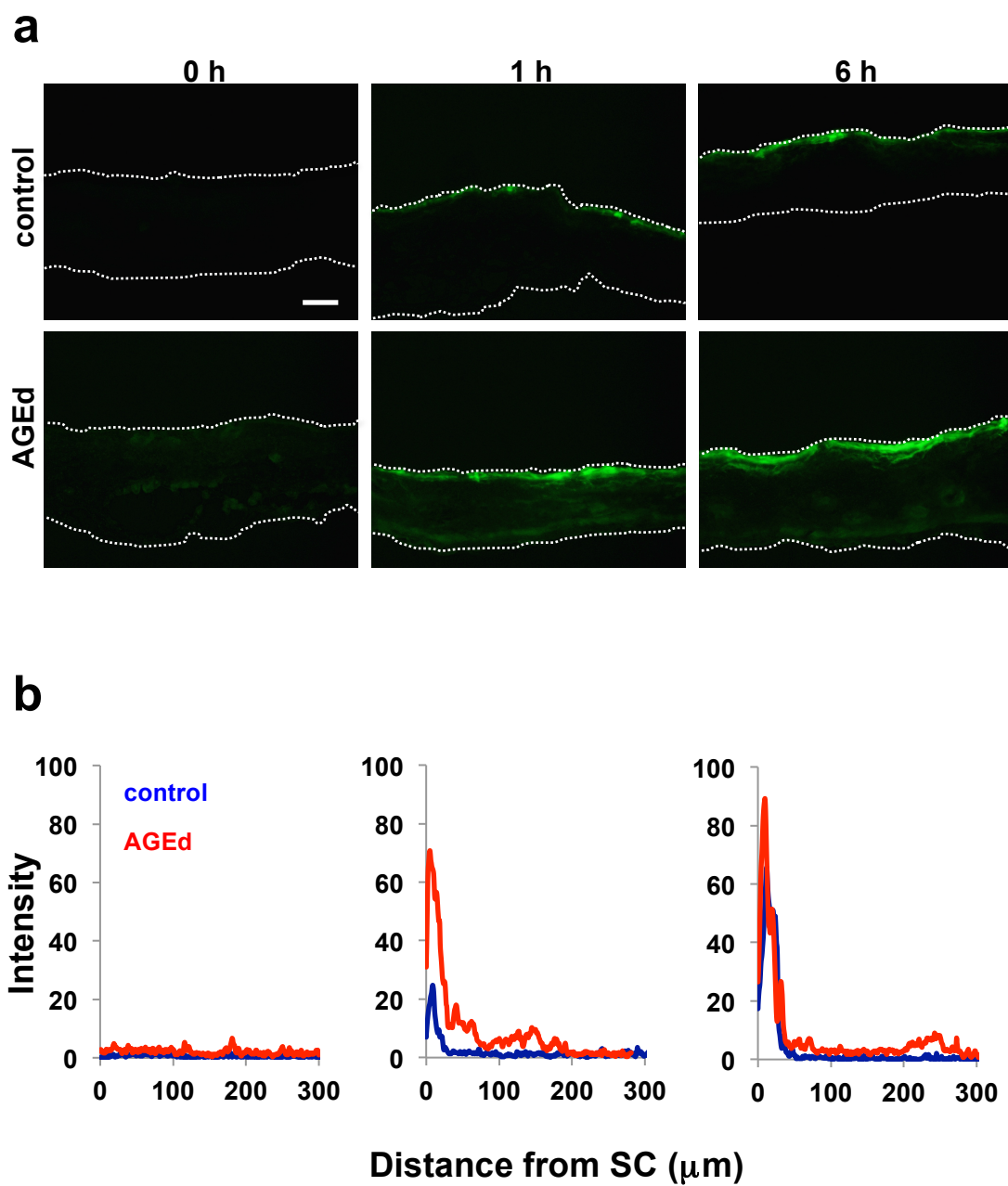


Figure 17. Outside-in penetration across excised glycated skin

Penetration pattern of FL-Na across normal and glycated skin at indicated time point (a) and vertical intensity derived from FL-Na at arbitrary line calculated using ImageJ (b). Glycation was induced by hydration with the 50 mM of GO in PBS at 32°C for 24 h. Bar = 100 μm .

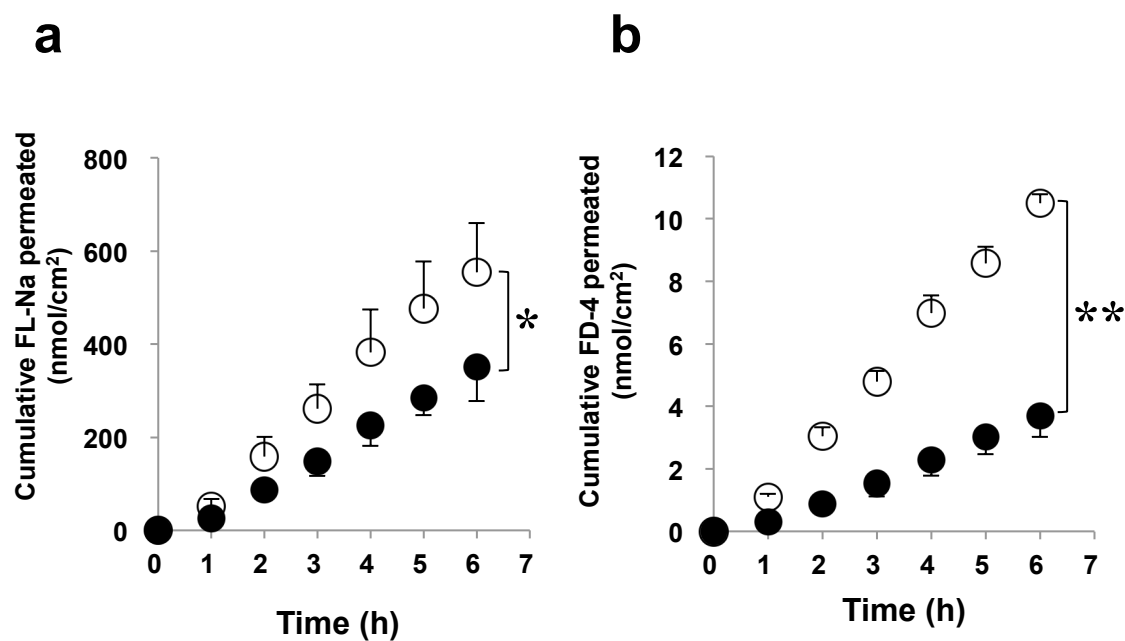


Figure 18. Permeation of hydrophilic molecules across glycated epidermis-dermis

Cumulative amount of FL-Na (a) and FD-4 (b) permeating across normal (○) and AGEd (●) epidermis-dermis. 1 mM of FL-Na and 0.25 mM of FD-4 in PBS were used as donor solutions. PBS was used as the receptor solution. All results are expressed as the mean \pm S.D. of $n = 3$ replicates. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, paired student's t -test.

第 4 節 考察

医薬品や部外品、化粧品の経皮適用に関しては、実使用の場においては必ずしも健康な皮膚に適用されるものではない。しかしながら、傷害を受けた皮膚や病態皮膚における化合物の透過性に関する報告は、現在まで非常に少なかった⁶⁵⁻⁶⁷⁾。そこで、本章においては簡易な糖化皮膚モデルを作製し、種々モデル化合物の皮膚透過プロファイルを明らかにした。一覧を Fig. 19 に示す。

糖化誘導に用いた GO は、グルコースの分解や解糖系の副産物として生成するジカルボニル化合物であり、その反応性の高さから非生理的なタンパク質付加体や架橋形成の原因となる^{43, 44)}。ヒト血清中の GO 濃度は 0.1-1 mM であり、糖尿病や腎疾患によりその濃度は増加し、長期間にわたり生体内で糖化を誘導することが知られている⁶⁸⁾。本実験においては、皮膚における AGEs の蓄積の指標と考えられている *b**値および自家蛍光の増加を指標とし、過剰量の GO を用いて加速的な条件下で糖化皮膚モデルを作製した^{19, 69)}。摘出ヘアレスマウス皮膚を 50 mM GO に 24 時間暴露し、作製した糖化皮膚モデルでは、AGEs は角層を含む皮膚全層において検出された。正常皮膚と比較し、皮膚ホモジネートの自家蛍光は 1.6 倍、*b**値は 2.1 倍であった (Figs. 13c & 14a)。これらの比率は、糖尿病患者の皮膚自家蛍光値として報告されている臨床データから得られる比率と近い値を示していることから⁷⁰⁾、透過試験で用いた GO 濃度 (50 mM) は妥当であると考えられる。また、これまで糖化皮膚におけるシワ形成は、表皮角化細胞や線維芽細胞から分泌されるマトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloprotease: MMPs) の活性化を介した ECM の分解が原因であることが知ら

れているが⁷¹⁾、本モデルにおいては GO による非生理的架橋が表面粗さを増加させたと考えられる (Table 3)。

一般的に化合物は皮膚透過する際、角層実質経路、および付属器官経路を通り、角層実質経路は角層実質を通る経細胞ルートと角層細胞間脂質を通る細胞間ルートに細分される⁷²⁾。近年の X 線構造解析の実験から、角層が結合水として有するおよそ 25 wt%の水分は角質細胞もしくは、角層細胞間脂質の短周期ラメラ構造中に存在していることが明らかとなっている^{73, 74)}。本検討においては、親水性化合物のみが糖化皮膚と正常皮膚で異なる透過挙動を示したことから (Fig. 16, Table 4)、短周期ラメラ構造に何らかの乱れが生じ、バリア機能を低下させたと予想される。

生きた表皮・真皮もまた、経皮吸収を考える上で重要なバリアであると考えられている^{75, 76)}。その主体は TJ である。角層除去皮膚における Flux ratio_{FD4/FLNa} が 0.02 であることは生きた表皮に分子量依存的なバリアが存在することを意味し、この事実を裏付けている。しかしながら、角層を除去した糖化皮膚における水溶性化合物の透過性は減少した。この理由として、表皮-真皮における極性の変化が挙げられる。GO が親水性アミノ酸残基である Lys や Arg 等と反応すると、共有結合により表皮-真皮が疎水性に傾くため、水溶性化合物の分配や貯留が起こりにくくなると考えられる。以上の結果から、(1) 糖化した表皮において、角層は化合物の透過性を制御していること (2) 親水性化合物の透過性に対して糖化した角層は促進的に、表皮-真皮は抑制的に機能することが示唆された。

今回使用した *in vitro* 糖化皮膚モデルにおいては、同一の化合物が GO 処理、角層の有無により様々な透過プロファイルを示した。これは、従来の経皮吸収の原則では予測されない結果であり、糖化をはじめ、様々な病態を有する皮膚における経皮吸収特性については詳細な理解が求められることを示唆している。例えば、糖化皮膚を介してインスリンのような水溶性で高分子量の化合物の全身循環系への送達を考える場合は正常皮膚を介した透過量よりも少ない量しか吸収されない可能性があり、紫外線散乱剤のように浸透させない処方を考える場合、角層の糖化により期せずして浸透してしまう可能性もある。糖化皮膚のテープストリッピングによる角層 AGEs の検出、*b**値や自家蛍光による糖化レベルの予測や製剤学的な制御が可能となれば、日常的に使用する化粧品を含め、外用剤の有効性・安全性をより高めることができると考えられる。実際の生体の糖化による角層の構造変化等、詳細なメカニズムの解明は必要であるが、糖化皮膚に対して効率的な化合物の適用を考えるには、生物学的な変化に加え、物理的な変化、皮内動態、そしてデバイスの学際的な研究が重要であるといえる。

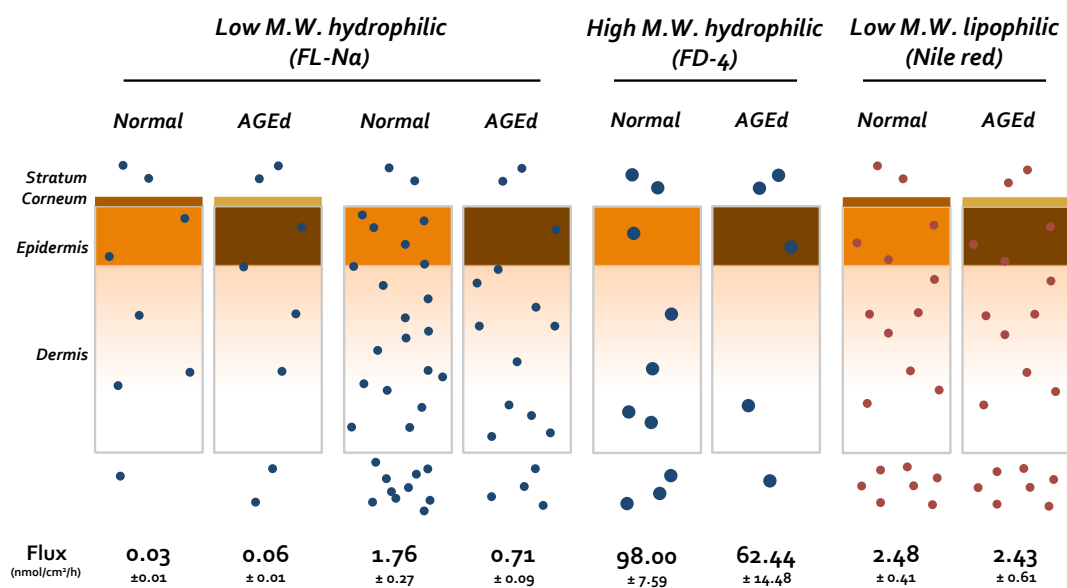


Figure 19. Permeation and accumulation of compounds to *in vitro* glycated skin

第 3 章

ヒト皮膚における Glycer-AGEs の蓄積

第 1 節 緒論

生体内においてメイラード反応を誘導するカルボニル化合物は多岐に渡る。還元糖やその分解物、糖代謝の中間体等がそれにあたり、カルボニル化合物による AGEs の分類も試みられている (Fig. 20)⁷⁷⁾。糖代謝やポリオール経路の代謝中間体であるグリセルアルデヒド (Glyceraldehyde: GA) は、近年、グリセルアルデヒド由来 AGEs (Glycer-AGEs) の形成を介した生活習慣病の病態形成への寄与が指摘されている。Glycer-AGEs はより細胞内の糖代謝の状態を反映した AGEs であると考えられており、例えば、糖尿病性腎症や神経症患者においては、Glycer-AGEs の組織沈着が報告されている^{78, 79)}。さらに、メラノーマ細胞において、Glycer-AGEs による RAGE を介した活性酸素種の産生ががん悪性を促すことも報告されている⁸⁰⁾。

これまで、表皮 AGEs の存在は主にグリオキサル由来の AGEs であるカルボキシメチルリジン (Carboxymethyl lysine: CML) を検出する抗体を用いて確認されているが、表皮の 95% を表皮角化細胞が占めることから、表皮における Glycer-AGEs の存在には興味もたれる。

そこで第三章では、Glycer-AGEs に特異的に反応する抗体を用いて、ヒト皮膚組織における Glycer-AGEs の存在および分布を調査した。さらに、*in vitro* 糖化モデル皮膚を GO および GA を用いて作製し、皮膚色や水分バリアに関する基礎

的な比較検討を行った。さらに、塩基性アミノ酸である Lysine (Lys) を基質とした際に糖化反応により修飾されたアミノ酸量を、アミノ酸分析によって測定し、ヒト皮膚に与える Glycer-AGEs の影響について考察した。

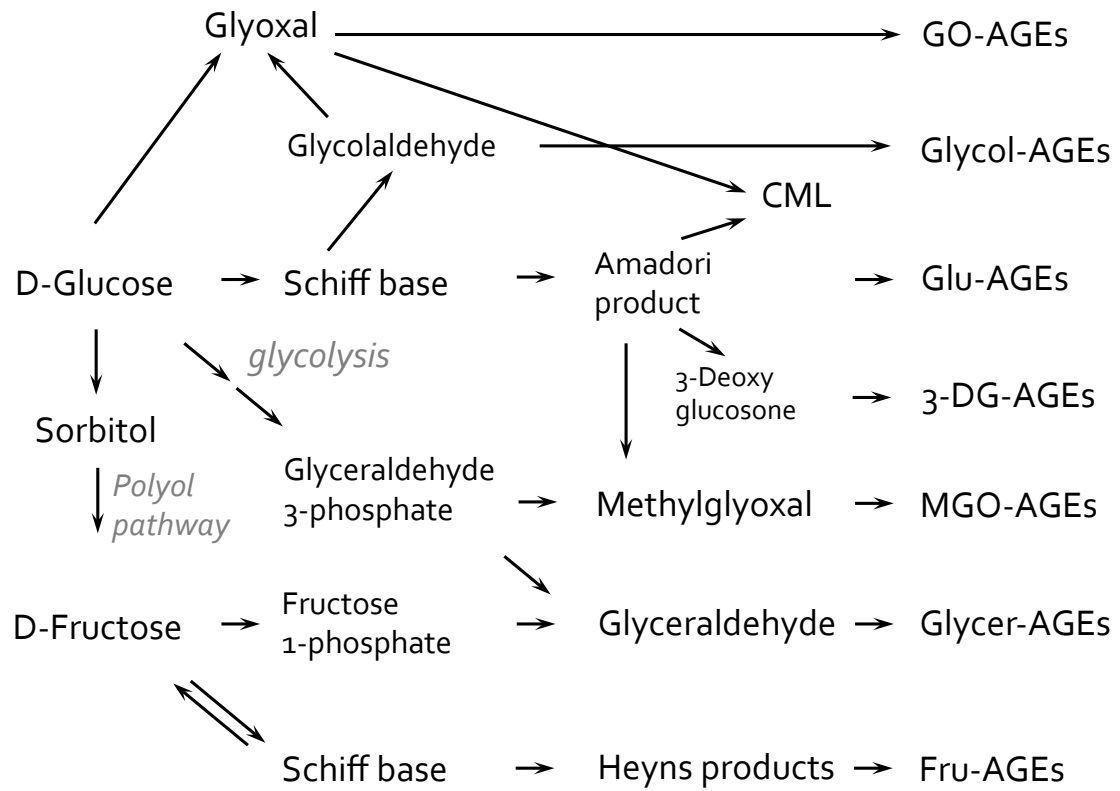


Figure 20. Classification of AGEs by glycation inducer

Fru: Fructose, Glu: Glucose

第 2 節 実験方法

2-1. 試薬および実験材料

ヒト皮膚は、BIOPREDIC INTERNATIONAL (Saint-Grégoire, France) より購入した。ウサギ由来抗 Glycer-AGEs ポリクローナル抗体およびブロッキングペプチドは、金沢医科大学先端医療研究領域糖化制御研究分野、竹内正義教授より供与された⁸¹⁾。DL-Glyceraldehyde は、Sigma より購入した。L-(+)-Lysine は東京化成工業株式会社より購入した。クエン酸ナトリウム、pH 2.2 クエン酸リチウム緩衝液、塩酸（試薬特級）、は和光純薬工業株式会社より購入した。

2-2. 免疫蛍光染色

皮膚は、4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋を行った。脱パラフィン後、10 mM pH 6 クエン酸ナトリウム溶液中で加熱することにより抗原の賦活化を行った。1% BSA/PBS(-)溶液で室温、1 時間反応させることによりブロッキングを行った。1 次抗体反応は、抗 Glycer-AGEs 抗体を 1% BSA/PBS(-)溶液に 1/200 で希釈し、4℃、オーバーナイトで処理を行った。ブロッキングペプチド処理群は、ブロッキングペプチドと室温にて 1 時間反応させた抗体を用いて同処理を行った。結合した抗体を Alexa488 標識の 2 次抗体 (Life Technologies) (1/200、抗体/1% BSA/PBS(-)溶液) で室温、1 時間処理することにより可視化した。洗浄後、Hoechst33258 で核染色を施し、倒立顕微鏡 IX71 (オリンパス株式会社) を用いて蛍光観察を行った。

2-3. 実験動物

実験動物は第二章と同種のものを、同様の方法で入手・使用した。

2-4. マウス皮膚の糖化誘導

マウス皮膚への糖化誘導は第二章と同様の方法で行った。糖化誘導剤として、PBS(-) (コントロール)、10 mM もしくは 50 mM の GA および GO 含有 PBS(-) (AGEd モデル) を適用した。

2-5. 皮膚計測

皮膚色の測定および皮膚自家蛍光の測定は、第二章と同様の方法で行った。

2-6. アミノ酸分析

アミノ酸分析は池田らの方法に一部改変を加えて行った⁸²⁾。10 mM Lys を 50 mM の GO、GA と PBS(-) 溶液中、37℃で反応させた。各サンプルは 6N の塩酸中、110℃、8 時間加水分解を行った後、フィルター濾過を行った。pH 2.2 クエン酸リチウム緩衝液で希釈後、アミノ酸分析機 JLC-500 (日本電子) を用いて非修飾のアミノ酸量を測定した。修飾された Lys 残基量は、Eq. 4 より算出した。

Eq. 4

$$\text{Lys}_{\text{modified}} = \text{Lys}_{\text{control}} - \text{Lys}_{\text{unmodified}}$$

2-7. 統計解析

データは mean \pm S.D.で表し、SAS University Edition (SAS Institute, Cary, NC, U.S.A.)を用いて統計処理を行った。危険率 5%未満 ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$) を有意差ありとした。

第3節 結果

3-1. ヒト皮膚における Glycer-AGEs の観察

Glycer-AGEs はヒト表皮および真皮に発現が確認されたが、ブロッキングペプチドの存在下では Glycer-AGEs 由来の蛍光は消失した。Glycer-AGEs は角層および表皮に強い蛍光が認められ局在が観察された。一方、真皮においては ECM に顕著な Glycer-AGEs の蓄積は認められなかったが、細胞内には Glycer-AGEs 由来の蛍光が観察された。年齢依存的な Glycer-AGEs の量や分布の差は認められなかった (Fig. 21)。

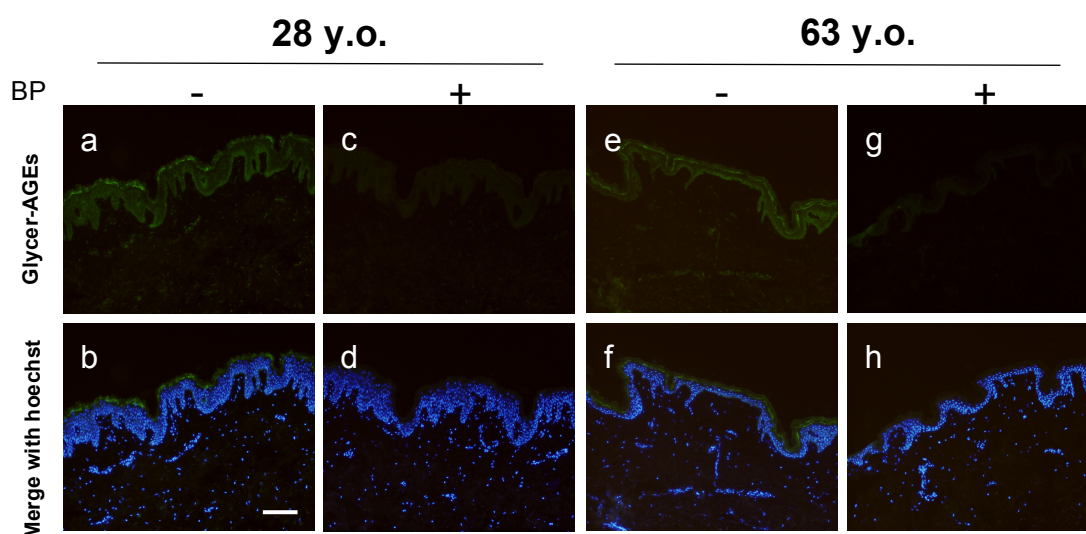


Figure 21. Presence of Glycer-AGEs in skin sections from 28 y.o. (a-d) and 63 y.o. (e-h) human abdominal area

Blocking peptide (BP) to anti Glycer-AGEs antibody treated section showed no significant signal (c,d & g,h). Bar = 100 μ m.

3-2. Glyoxal、Glyceraldehyde による *in vitro* 糖化誘導皮膚の比較

GO、GA を糖化誘導剤として *in vitro* 糖化皮膚モデルを作製し、24 時間後までの自家蛍光および色調の変化を比較した (Fig. 22a)。Ex 365 nm/ Em 450 nm における自家蛍光の値は、GA では GO と比較し 3.0 倍に増加した (Fig. 22b)。黄味を表す b^* 値は GA では GO と比較し 2.2 倍となり、いずれも GA において高値を示した (Fig. 22c)。また、GO 誘導群では 6 時間で自家蛍光値、色調共に頭打ちになったのに対し、GA 誘導群では上昇し続ける傾向が認められた。

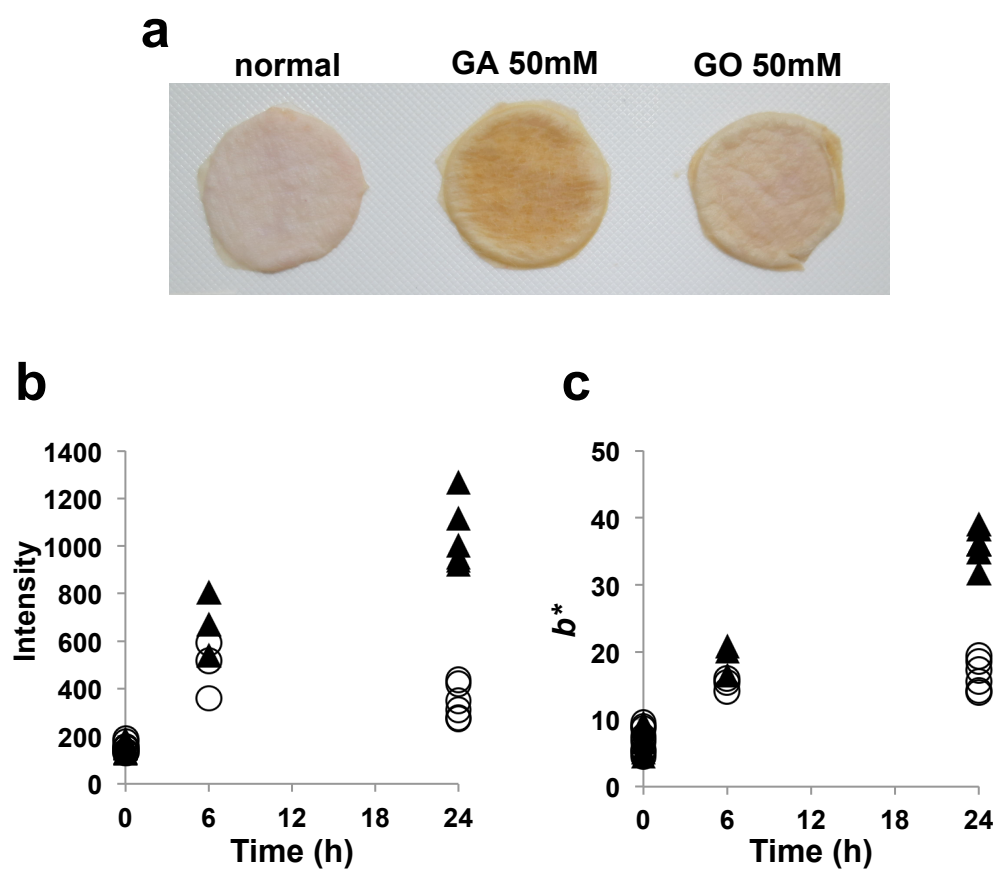


Figure 22. Comparison of skin glycation features induced by GO or GA

Macroscopic view of hairless mouse skin glycated using GO or GA (a), rate of increase in AGE formation indicated by fluorescence intensity (Ex: 365 nm/ Em: 450 nm) (b) and b^* value (c). Glycation induced by 50 mM of GO: ○, or GA: ▲.

3-3. Glyoxal、Glyceraldehyde による修飾 Lys 量の測定

AGEs 形成の際に基質となる塩基性アミノ酸残基と、GA、GO との反応性を明らかにするため、37°C で糖化反応を誘導した後の修飾アミノ酸量をアミノ酸分析により測定した。Lys、Arg をそれぞれ糖化誘導剤と反応させると、Lys のみが時間変化に伴い黄味を呈したことから (data not shown)、基質には Lys を用いた。50 mM の GO、GA と反応させた際の修飾 Lys 量は、反応 12 時間、24 時間において GO 処理群では、716.78、637.29 nmol/mL、GA 処理群では 1136.25、1098.62 nmol/mL となり、いずれの条件でも GA 処理群で有意に増加した (12 h: $p < 0.01$, 24 h: $p < 0.05$) (Fig. 23)。

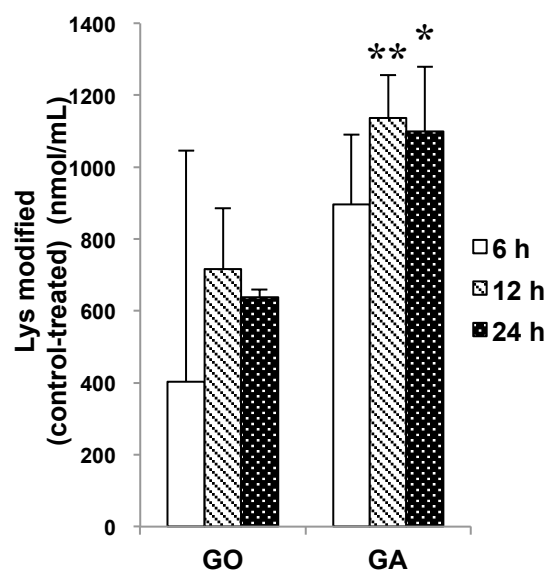


Figure 23. Amount of Lys modified by GO or GA determined by amino acid analysis

Amount of intact Lys was determined after 6 h, 12 h or 24 h incubation with 50 mM of GO or GA. All results are expressed as the mean \pm S.D. of $n = 3$ replicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, paired student's t -test between GO and GA at each time point.

第4節 考察

これまで皮膚に蓄積する AGEs として報告されている CML は、長く AGEs の研究対象であった ECM および表皮 K10 に蓄積していることが知られているが、皮膚中 Glycer-AGEs は、表皮、真皮共に細胞内の蓄積が顕著に見られた。このことから、皮膚における Glycer-AGEs の蓄積は、他の臓器で報告されているのと同様に糖尿病のような代謝異常疾患の細胞内の糖代謝の変化を強く反映していると考えられる。本検討では年齢による Glycer-AGEs 蓄積の差異は認められなかった (Fig. 21)。しかしながら、Park らの報告にあるように、AGEs は RAGE の発現量そのものを亢進させ、炎症を誘発することが報告されているため、何らかの生理的意義を有すると予想される³⁷⁾。

さらに、自家蛍光と b^* 値の増加、およびアミノ酸分析による修飾 Lys 残基量の測定から、GA は GO よりも速く皮膚に糖化を誘導すること、つまり、Glycer-AGEs は糖化の初期段階で蓄積されることが示唆された。また、糖化による蛍光強度や黄味の増加が、時間経過・濃度変化共に GO 誘導と GA 誘導では頭打ちになるタイミングや強度が異なることも、糖化誘導剤によって特徴的な AGEs 集団を形成することを裏付けており、非常に興味深い。

今後詳細な解析が必要となるが、本検討から皮膚に蓄積した Glycer-AGEs は、ECM のみならず、正常な表皮角化細胞・線維芽細胞に蓄積し、CML とは異なる存在意義を有すると考えられた。

結論

化合物の経皮的な送達は、その非侵襲性や投与コントロールの簡便性、肝初回通過効果を避けられる代謝面での優位性から魅力的な投与手段として古くから利用されている。近年の高齢化や食習慣の変化により、慢性的な高血糖状態により組織に沈着する終末糖化産物（AGEs）が皮膚に対しても老化の一因であることが明らかとなっている。表皮・真皮における AGEs の蓄積は、炎症反応、糖尿病患者の重症度所見等の疾患に関連する所見にとどまらず、審美的な観点からも重要視されている。

AGEs の特徴的な性質として、メイラード反応を介した非生理的な架橋の形成による構造的影響と、AGEs 受容体や細胞内蓄積による小胞体ストレス等による生理的影響が挙げられる。表皮で活発に合成される脂質から構成される角層は、角質細胞とそれを取りまく角層細胞間脂質より構成され、その脂質は規則的なラメラ構造を有し、バリア機能に重要な役割を果たす。

本研究では AGEs が有するこれらの性質は表皮のバリア機能へ何らかの影響を与えていることを予想し、表皮における角層細胞間脂質代謝、糖化皮膚の基礎的な化合物透過プロファイル、およびヒト皮膚中の AGEs の蓄積・分布について研究を行った。まとめを Fig. 24 に示す。

第一章では、糖化が表皮バリアに与える生理的な影響を調査した。生体内で存在が確かめられているジカルボニル化合物であるグリオキサール（GO）を、三次元培養表皮および培養表皮角化細胞株である HaCaT 細胞に処理し、糖化モ

デル表皮および細胞とした。糖化モデル表皮において、GO 処理依存的な水分蒸散バリア機能の低下が認められたことから、皮膚最大のバリアである角層に着目し、表皮中に含まれる角層細胞間脂質量、および関連する代謝酵素の遺伝子発現量を調査した。特に慢性的な糖化を表したモデルにおいては、セラミドおよびコレステロール量は低下し、脂肪酸量は増加した。糖化誘導細胞においては、セラミド合成酵素の遺伝子発現量の減少、脂肪酸合成酵素や伸長酵素の増加が認められた。これらの脂質構成の変動がラメラ構造へ反映された際の膜流動性を明らかにするため、角層細胞間脂質リポソームを作製し、物性評価および膜流動性の測定を行った。糖化表皮の脂質構成を模倣したリポソームでは、安定性は正常なものと同等であったものの、高い膜流動性が観察された。これらのことから、GO 処理により誘導される糖化の生理学的な作用の一つとして、表皮脂質代謝が乱れ、脂質ラメラ流動性の増加を引き起こすことが示唆された。生きた表皮に存在する皮膚第二のバリアであるタイトジャンクション (TJ) もまた、低分子水溶性物質に対するバリアとして重要な機能を果たすことから、GO 処理後の TJ 関連遺伝子発現量を測定した。*CLDN1*、*CLDN4*、*OCLDN* の発現量は GO 処理により増加した。機能の発現について精査が必要であるが、角層バリアの乱れを相補している可能性が示唆された。

第二章では、糖化皮膚における化合物透過性の変化を、*in vitro* 糖化皮膚モデルを作製し、検討した。糖化皮膚モデルは黄色化・表面シワの形成等典型的な老化形質を示した。水溶性低分子化合物であるフルオレセインナトリウム

(FL-Na, M.W. 376.28) の全層皮膚を介した透過性は糖化誘導皮膚で高くなったが、脂溶性低分子化合物であるナイルレッド (Nile red, M.W. 318.37) では正常皮膚と同等の透過性を示した。次に、角層の寄与を検討するため、FL-Na の皮膚浸透を蛍光観察により観察すると、糖化モデル皮膚では正常な皮膚よりも速く移行する様子が観察された。さらに、テープストリップを施し角層を除去した糖化皮膚モデルを作製し、FL-Na やより分子量の大きなフルオレセインイソチオシアナートデキストラン (FD-4, average M.W. 4,000) の透過について検討を行った。角層を剥離した皮膚を介すると、糖化皮膚の方が FL-Na の透過性はむしろ低くなった。これらの結果は一般的な経皮吸収理論とは異なっており、糖化をはじめ、様々な病態を有する皮膚における経皮吸収特性については詳細な理解が求められることを示唆するものである。

第三章では、これまで皮膚中で存在が確認されている GO 由来の AGEs とは由来の異なるグリセルアルデヒド (GA) 由来の AGEs (Glycer-AGEs) に着目し、皮膚における存在や分布を観察した。免疫蛍光染色の観察像より、Glycer-AGEs は表皮に多く存在し、特に細胞内に限局して存在することが示された。皮膚に存在する AGEs には様々なカルボニル化合物に由来するヘテロな集団であり、糖化誘導速度の速い GA が、初期の皮膚 AGEs 蓄積に重要な役割を担うことが示唆された。

GO は糖化研究で汎用されている誘導剤であるが^{69), 83)}、生体内で起こるような緩和な糖化は時間を要する反応であり、*in vitro* 試験での再現は困難である。

そのため、本章のデータを含め多くの報告が極端な糖化条件を使用して得られていることには留意すべきである。しかしながらこれら無限系の基礎的データより得られる考察は生理的な糖化を考える上で重要である。今後はヒト組織や細胞を用い、より生体に近い系で糖化の影響を評価することが課題である。構造的な変化・生理学的な変化の複合的な要因を反映した皮膚を用いて、実際の皮膚で見られる影響や糖化の寄与について探索したい。

以上、本学位論文より、表皮の糖化は、表皮、特に角層のバリアを構成脂質の代謝、および構造上の変化の両面から低下させることが明らかとなった。また、これらは皮膚中に存在するヘテロな AGEs 集団により引き起こされることが示唆された。本研究は糖化と皮膚バリア機能の重要な基礎的検討であり、個人の皮膚特性に応じた医薬品・化粧品の適用を考える際の有用な知見となると考えられる。

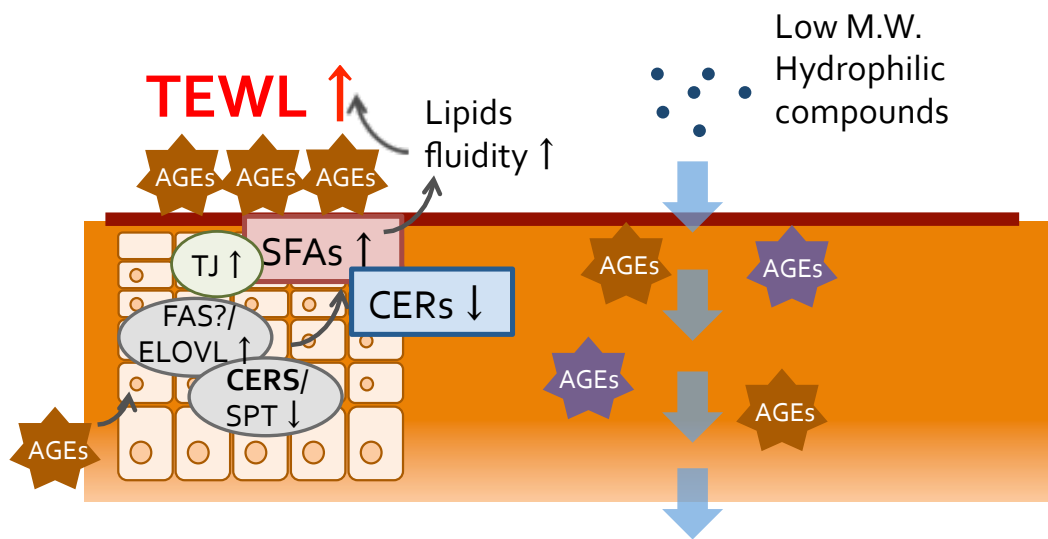


Figure 24. The effects of glycation on epidermal barrier function

謝辞

本研究の遂行に際し、終始御懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました城西大学薬学部 皮膚生理学講座 徳留 嘉寛 教授に深く感謝致します。また、研究室での生活に際して多大なるご協力をいただきました 城西大学薬学部 皮膚生理学講座 の皆様に深甚なる感謝の意を表します。さらに、抗体を供与いただいた 金沢医科大学 竹内 正義 教授、学位取得の機会を与えてくださり、ご指導、ご助言いただきました 東京工科大学 正木 仁 教授、いつもあたたかくご支援いただきました 株式会社 CIEL 岡野 由利 様に多大な感謝の意を表します。本論文の作成にあたり、ご教示とご校閲を頂きました 荒田 洋一郎 教授ならびに 加園 恵三 教授、 金本 郁男 教授、 夏目 秀視 教授、 杉林 堅次 教授に感謝の意を表します。

最後に、本研究のために犠牲になった動物に感謝し、追悼の意を表します。

参考文献

- 1 Feingold KR. Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J. Lipid. Res.*, **48**, 2531-46 (2007).
- 2 Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat. Biotechnol.*, **26**, 1261–1268 (2008).
- 3 Murthy SN. Transdermal drug delivery: approaches and significance. *RRTD*, 1–2 (2012).
- 4 Schoellhammer CM, Blankschtein D, Langer R. Skin permeabilization for transdermal drug delivery: recent advances and future prospects. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **11**, 393–407 (2014).
- 5 Swartzendruber DC, Wertz PW, Kitko DJ, Madison KC, Downing DT. Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.*, **92**, 251-257 (1989).
- 6 Bouwstra JA, Gooris GS, Bras W, Downing DT. Lipid organization in pig stratum corneum. *J. Lipid. Res.*, **36**, 685-695 (1995).
- 7 Wertz PW, Downing DT, Freinkel RK, Traczyk TN. Sphingolipids of the stratum corneum and lamellar granules of fetal rat epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **83**, 193-195 (1984).
- 8 Freinkel RK, Traczyk TN. Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **85**, 295-298 (1985).

- 9 Grayson S, Johnson-Winegar AG, Wintroub BU, Isseroff RR, Epstein EH Jr, Elias PM. Lamellar body-enriched fractions from neonatal mice: preparative techniques and partial characterization. *J. Invest. Dermatol.*, **85**, 289-294 (1985).
- 10 Wertz PW. Epidermal lipids. *Semin. Dermatol.*, **11**, 106-113 (1992).
- 11 Elias PM, Feingold KR, Fartasch M. Epidermal lamellar body as a multifunctional secretory organelle. In *Skin Barrier*. P. Elias and K. Feingold, editors. Taylor & Francis, New York. 261–272 (2006)."
- 12 Swartzendruber DC, Wertz PW, Madison KC, Downing DT. Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J. Invest. Dermatol.*, **88**, 709-713 (1987).
- 13 Bouwstra JA, Gooris GS, van der Spek JA, Bras W. Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J. Invest. Dermatol.*, **97**, 1005-1012 (1991).
- 14 Maillard LC. Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. *C. R. Acad. Sci.*, **154**, 66-68 (1912).
- 15 Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N ϵ -(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J. Clin. Invest.*, **99**, 457–468 (1997).
- 16 Crisan M, Taulescu M, Crisan D, Cosgarea R, Parvu A, Cătoi C, Drugan T. Expression of advanced glycation end-products on sunexposed and non-exposed cutaneous sites during the ageing process in humans. *PLoS ONE*, **8**, e75003 (2013).

- 17 Zhu P, Ren M, Yang C, Hu YX, Ran JM, Yan L. Involvement of RAGE, MAPK and NF-kappaB pathways in AGEs-induced MMP-9 activation in HaCaT keratinocytes. *Exp. Dermatol.*, **21**, 123–129 (2012).
- 18 Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.*, **2**, 411-429 (2014).
- 19 Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, Elmets CA, Dauchot P, Kohn RR. Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N. Engl. J. Med.*, **314**, 403–408 (1986).
- 20 Kawabata K, Yoshikawa H, Saruwatari K, Akazawa Y, Inoue T, Kuze T, Sayo T, Uchida N, Sugiyama Y. The presence of Nε-(carboxymethyl)lysine in the human epidermis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1814**, 1246–1252 (2011).
- 21 Yoshinaga E, Kawada A, Ono K, Fujimoto E, Wachi H, Harumiya S, Nagai R, Tajima S. Nε-(Carboxymethyl)lysine modification of elastin alters its biological properties: implications for the accumulation of abnormal elastic fibers in actinic elastosis. *J. Invest. Dermatol.*, **132**, 315–323 (2012).
- 22 Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, Bijlsma JW, Lafeber FP, Baynes JW, TeKoppele JM. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.*, **275**, 39027–39031 (2000).
- 23 Sakai S, Kikuchi K, Satoh J, Tagami H, Inoue S. Functional properties of the stratum corneum in patients with diabetes mellitus: similarities to senile xerosis. *Br. J.*

Dermatol., **153**, 319–323 (2005).

24 Lohwasser C, Neureiter D, Weigle B, Kirchner T, Schuppan D. The receptor for advanced glycation end products is highly expressed in the skin and upregulated by advanced glycation end products and tumor necrosis factor- α . *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 291–299 (2006).

25 Leibold JS, Riehl A, Hettinger J, Durben M, Hess J, Angel P. Keratinocyte-specific deletion of the receptor RAGE modulates the kinetics of skin inflammation in vivo. *J. Invest. Dermatol.*, **133**, 2400–2406 (2013).

26 Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, **140**, 900–917 (2010).

27 Wang H, Kouri G, Wollheim CB. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity. *J. Cell. Sci.*, **118**, 3905–3915 (2005).

28 Cui W, Ma J, Wang X, Yang W, Zhang J, Ji Q. Free fatty acid induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis of β -cells by Ca^{2+} /calpain-2 pathways. *PLoS One*, **8**, e59921 (2013).

29 Gkogkolou P, Bohm M. Advanced glycation end products: Key players in skin aging? *Dermatoendocrinol.* **4**, 259–270 (2012).

30 Feingold KR. The outer frontier: the importance of lipid metabolism in the skin. *J. Lipid. Res.*, **50**, Suppl:S417–422 (2009).

31 Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J. Biol. Chem.*, **276**, 14890–14895 (2001).

- 32 Arner P. Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **18**, S5–S9 (2002).
- 33 Kitatani K, Asano S, Hashimoto M, Taniguchi M, Okazaki T. Ceramide-centered sphingolipid metabolism. *Seikagaku*. **83**, 495-505 (2011).
- 34 Rabionet M, Gorgas K, Sandhoff R. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1841**, 422-434 (2014).
- 35 Taniguchi M, Okazaki T. The role of sphingomyelin and sphingomyelin synthases in cell death, proliferation and migration-from cell and animal models to human disorders. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1841**, 692-703 (2014).
- 36 Sakai S, Endo Y, Ozawa N, Sugawara T, Kusaka A, Sayo T, Tagami H, Inoue S. Characteristics of the epidermis and stratum corneum of hairless mice with experimentally induced diabetes mellitus. *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 79-85 (2003).
- 37 Park HY, Kim JH, Jung M, Chung CH, Hasham R, Park CS, Choi EH. A long-standing hyperglycaemic condition impairs skin barrier by accelerating skin ageing process. *Exp. Dermatol.*, **20**, 969-974 (2011).
- 38 Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911–917 (1959).
- 39 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 40 Hamanaka S, Hara M, Nishio H, Otsuka F, Suzuki A, Uchida Y. Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J.*

Invest. Dermatol., **119**, 416–423 (2002).

41 Uchida Y, Hama H, Alderson NL, Douangpanya S, Wang Y, Crumrine DA, Elias PM, Holleran WM. Fatty acid 2-hydroxylase, encoded by FA2H, accounts for differentiation-associated increase in 2-OH ceramides during keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, **282**, 13211–13219 (2007).

42 Wertz PW, Abraham W, Landmann L, Downing DT. Preparation of liposomes from stratum corneum lipids. *J. Invest. Dermatol.*, **87**, 582–584 (1986).

43 Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS, Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J.*, **344**, 109–116 (1999).

44 Sady C, Jiang CL, Chellan P, Madhun Z, Duve Y, Glomb MA, Nagaraj RH. Maillard reactions by α -oxoaldehydes: detection of glyoxal-modified proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1481**, 255–264 (2000).

45 Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J. Invest. Dermatol.*, **96**, 523–526 (1991).

46 Di Nardo A, Wertz P, Giannetti A, Seidenari S. Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta. Derm. Venereol.*, **78**, 27–30 (1998).

47 Imokawa G. A possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of

sphingomyelin and glucosylceramide. *J. Dermatol. Sci.*, **55**, 1-9 (2009).

48 Elias PM. Lipid abnormalities and lipid-based repair strategies in atopic dermatitis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1841**, 323-330 (2014).

49 Loiseau N, Obata Y, Moradian S, Sano H, Yoshino S, Aburai K, Takayama K, Sakamoto K, Holleran WM, Elias PM, Uchida Y. Altered sphingoid base profiles predict compromised membrane structure and permeability in atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.*, **72**, 296-303 (2013).

50 Kim EJ, Kim MK, Jin XJ, Oh JH, Kim JE, Chung JH. Skin aging and photoaging alter fatty acids composition, including 11,14,17-eicosatrienoic acid, in the epidermis of human skin. *J. Korean. Med. Sci.*, **25**, 980–983 (2010).

51 Kim EJ, Jin XJ, Kim YK, Oh IK, Kim JE, Park CH, Chung JH. UV decreases the synthesis of free fatty acids and triglycerides in the epidermis of human skin in vivo, contributing to development of skin photoaging. *J. Dermatol. Sci.*, **57**, 19–26 (2010).

52 Uchida Y. The role of fatty acid elongation in epidermal structure and function. *Dermatoendocrinol.*, **3**, 65–69 (2011).

53 Ohno Y, Nakamichi S, Ohkuni A, Kamiyama N, Naoe A, Tsujimura H, Yokose U, Sugiura K, Ishikawa J, Akiyama M, Kihara A. Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **112**, 7707–7712 (2015).

54 Fluhr JW, Kao J, Jain M, Ahn SK, Feingold KR, Elias PM. Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *J.*

Invest. Dermatol., **117**, 44–51 (2001).

55 Mullen TD, Hannun YA, Obeid LM. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem. J.*, **441**, 789-802 (2012).

56 Jennemann R, Rabionet M, Gorgas K, Epstein S, Dalpke A, Rothermel U, Bayerle A, van der Hoeven F, Imgrund S, Kirsch J, Nickel W, Willecke K, Riezman H, Gröne HJ, Sandhoff R. Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 586-608 (2012).

57 Mizutani Y, Mitsutake S, Tsuji K, Kihara A, Igarashi Y. Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie*. **91**, 784-790 (2009).

58 Listenberger LL, Schaffer JE. Mechanisms of lipoapoptosis: implications for human heart disease. *Trends. Cardiovasc. Med.*, **12**, 134–138 (2002).

59 Wang Y, Botolin D, Xu J, Christian B, Mitchell E, Jayaprakasam B, Nair MG, Peters JM, Busik JV, Olson LK, Jump DB. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J. Lipid. Res.*, **47**, 2028–2041 (2006).

60 Strable MS, Ntambi JM. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **45**, 199–214 (2010).

61 Tokudome Y, Saito Y, Sato F, Kikuchi M, Hinokitani T, Goto K. Preparation and characterization of ceramide-based liposomes with high fusion activity and high membrane fluidity. *Colloids Surf. B Biointerfaces.*, **73**, 92-96 (2009).

62 De Vries JE, Vork MM, Roemen TH, de Jong YF, Cleutjens JP, van der

Vusse GJ, van Bilsen M. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J. Lipid. Res.*, **38**, 1384–1394 (1997).

63 Paumen MB, Ishida Y, Muramatsu M, Yamamoto M, Honjo T. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **272**, 3324–3329 (1997).

64 Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.*, **9**, 165–169 (2000).

65 Jakasa I, Verberk MM, Esposito M, Bos JD, Kezic S. Altered penetration of polyethylene glycols into uninvolved skin of atopic dermatitis patients. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 129–134 (2007).

66 Hung CF, Fang CL, Al-Suwayeh SA, Yang SY, Fang JY. Evaluation of drug and sunscreen permeation via skin irradiated with UVA and UVB: comparisons of normal skin and chronologically aged skin. *J. Dermatol. Sci.*, **68**, 135–148 (2012).

67 Chiang A, Tudela E, Maibach HI. Percutaneous absorption in diseased skin: an overview. *J. Appl. Toxicol.*, **32**, 537–563 (2012).

68 Kielhorn J, Pohlenz-Michel C, Schmidt S, Mangelsdorf I. Concise International Chemical Assessment Document 57. World Health Organization, Geneva, 2004.

69 Ogura Y, Kuwahara T, Akiyama M, Tajima S, Hattori K, Okamoto K, Okawa S, Yamada Y, Tagami H, Takahashi M, Hirao T. Dermal carbonyl modification is

related to the yellowish color change of photo-aged Japanese facial skin. *J. Dermatol. Sci.*, **64**, 45–52 (2011).

70 Mulder DJ, Water TV, Lutgers HL, Graaff R, Gans RO, Zijlstra F, Smit AJ. Skin autofluorescence, a novel marker for glyemic and oxidative stress-derived advanced glycation endproducts: an overview of current clinical studies, evidence, and limitations. *Diabetes Technol. Ther.*, **8**, 523–535 (2006).

71 Pigeon H, Bakala H, Monnier VM, Asselineau D. Collagen glycation triggers the formation of aged skin in vitro. *Eur. J. Dermatol.*, **17**, 12–20 (2007).

72 Barry BW. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J. Control. Release.*, **6**, 85–97 (1987).

73 Ohta N, Ban S, Tanaka H, Nakata S, Hatta I. Swelling of intercellular lipid lamellar structure with short repeat distance in hairless mouse stratum corneum as studied by X-ray diffraction. *Chem. Phys. Lipids.*, **123**, 1–8 (2003).

74 Nakazawa H, Ohta N, Hatta I. A possible regulation mechanism of water content in human stratum corneum via intercellular lipid matrix. *Chem. Phys. Lipids.*, **165**, 238–243 (2012).

75 Kirschner N, Houdek P, Fromm M, Moll I, Brandner JM. Tight junctions form a barrier in human epidermis. *Eur. J. Cell Biol.*, **89**, 839–842 (2010).

76 Andrews SN, Jeong E, Prausnitz MR. Transdermal delivery of molecules is limited by full epidermis, not just stratum corneum. *Pharm. Res.*, **30**, 1099–1109 (2013).

- 77 Takeuchi M. Serum levels of toxic AGEs (TAGE) may be a promising novel biomarker for the onset/progression of lifestyle-related diseases. *Diagnostics (Basel)*, E23 (2016).
- 78 Miura J, Yamagishi Si, Uchigata Y et al. Serum levels of non-carboxymethyllysine advanced glycation endproducts are correlated to severity of microvascular complications in patients with Type 1 diabetes. *J. Diabetes. Complications.*, **17**, 16-21 (2003).
- 79 Takino J, Yamagishi S, Takeuchi M. Cancer malignancy is enhanced by glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products. *J. Oncol.*, 739852 (2010).
- 80 Abe R, Shimizu T, Sugawara H et al. Regulation of human melanoma growth and metastasis by AGE-AGE receptor interactions. *J. Invest. Dermatol.*, **122**, 461-467 (2004).
- 81 Takeuchi M, Makita Z, Bucala R, Suzuki T, Koike T, Kameda Y. Immunological evidence that non-carboxymethyllysine advanced glycation end-products are produced from short chain sugars and dicarbonyl compounds in vivo. *Mol. Med.*, **6**, 114-125 (2000).
- 82 Ikeda K, Nagai R, Sakamoto T, Sano H, Araki T, Sakata N, Nakayama H, Yoshida M, Ueda S, Horiuchi S. Immunochemical approaches to AGE-structures: characterization of anti-AGE antibodies. *J. Immunol. Methods.*, **215**, 95-104 (1998).
- 83 Quan KK, Kusewitt DF, Hudson LG. Glyoxal leads to defective keratinocyte migration and down-regulation of Snai2 diabetes. *J. Dermatol. Sci.*, **73**, 166–169

(2014).